

**CONSTRUCTION D'UNE BANQUE GÉNOMIQUE
DE *STREPTOMYCES SCABIES* EF-35 :
IDENTIFICATION DE CLONES IMPLIQUÉS
DANS LE POUVOIR PATHOGÈNE**

par

Joanne Vachon

**mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès science (M. Sc.)**

**FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, juillet 1999

Le 05/11/99, le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.
date

Président-rapporteur: M. Claude Déry
Département de biologie

Membre: M. Ryszard Brzezinski
Département de biologie

Membre: Mme Carole Beaulieu
Département de biologie

SOMMAIRE

La gale commune de la pomme de terre est une maladie qui cause des pertes économiques importantes au Québec, mais aussi dans plusieurs pays du monde. Cette maladie peut aussi affecter d'autres types de cultures maraîchères comme le radis. La gale commune est associée à 4 espèces principales, soit *Streptomyces scabies*, *Streptomyces acidiscabies*, *Streptomyces caviscabies* et *Streptomyces turgidiscabies*. *S. scabies* est l'espèce qui occasionne le plus fréquemment la gale commune. De plus, ce microorganisme inhibe la croissance des jeunes plantules de monocotylédones et de dicotylédones. Les études taxonomiques sur les *Streptomyces* phytopathogènes ont démontré une grande diversité génétique à l'intérieur de ce groupe. Une caractéristique commune à ces microorganismes est qu'ils peuvent synthétiser des phytotoxines, nommées les thaxtomines. Les thaxtomines sont essentielles à la virulence des *Streptomyces* phythopatogènes. La thaxtomine est le seul mécanisme de virulence connu chez les actinomycètes phytopathogènes, mais d'autres molécules pourraient être impliquées dans la pathogenèse comme les enzymes hydrolytiques et les phytohormones. Les gènes de biosynthèse de la thaxtomine n'ont pas été clonés jusqu'à maintenant. Toutefois, le gène *necI* code pour un composé capable de causer des nécroses sur les tissus de pomme de terre. Le mécanisme de virulence de ces organismes pathogènes, ainsi que les régions génétiques leur étant associées sont très peu connus à ce jour. Le but de cette maîtrise de recherche est d'identifier de nouvelles régions génétiques impliquées dans le pouvoir pathogène de *S. scabies*. Pour atteindre ce but les objectifs suivants ont été fixés : 1) la construction d'une banque génomique de *S. scabies* EF-35, 2) la transformation des clones de la banque génomique dans un hôte hétérologue, *S. lividans* TK-24 et 3) l'analyse du pouvoir pathogène des colonies recombinantes sur les plantules de radis et la caractérisation partielle des clones affectant la croissance des radis.

La construction et la transformation de la banque génomique de *S. scabies* EF-35 dans un hôte hétérologue, *S. lividans* TK-24 a permis l'obtention de plusieurs colonies recombinantes. Le criblage sur plantule de radis s'est avéré une méthode efficace et rapide pour l'identification de clones pouvant affecter leur croissance. Douze clones ont été retenus, certains semblaient favoriser la croissance des plantules de radis tandis que d'autres pouvaient l'inhiber. Le clone 2.21 a été étudié plus en détails, car il pouvait inhiber la croissance des plantules de radis, causer des symptômes similaire à la gale superficielle sur les tubercules fils et produire un pigment jaune, le pigment V, s'avérant toxique sur les tissus de la pomme de terre.

L'analyse comparative entre le pigment V et la thaxtamine A a démontré que le pigment V avait plusieurs caractéristiques communes avec la thaxtamine A: coloration jaune, peu soluble dans l'eau, toxique sur rondelle de pomme de terre, un temps de rétention très proche sur HPLC et un spectre U.V. et visible similaire. La structure du pigment V reste à déterminer par analyse RMN et par un spectre de masse.

L'étude de l'ADN plasmidique du clone 2.21 a montré qu'il possédait un vecteur pFD666 sans insert. L'hybridation entre l'ADN total et une sonde de 1,7 Kb provenant du vecteur pFD666, a suggéré en outre qu'un autre plasmide contenant un insert et conférant les nouvelles propriétés génétiques à la souche hétérologue, *S. lividans* TK-24, se soit intégré au chromosome. Cette insertion chromosomique ne permet pas pour l'instant de caractériser les gènes nécessaires à la production du pigment V, mais nous proposons une méthode dans ce mémoire pour recloner ces gènes.

REMERCIEMENTS

Je voudrais en premier lieu remercier tout particulièrement ma directrice de recherche, le Dr Carole Beaulieu, pour m'avoir permis de faire une maîtrise sous sa direction. De plus, j'aimerais la remercier pour ses nombreux conseils, pour son support, son encouragement et la confiance qu'elle m'a apportés. Je voudrais aussi remercier mes deux conseillers, les Drs. Claude Déry et Ryszard Brzezinski pour leur aide et leurs précieux conseils.

Je voudrais aussi remercier le Dr Antonin Gautier pour son aide apporté dans la construction de la banque génomique, ainsi que le Dr. Luc Ruest pour ses conseils en chimie.

De plus, je voudrais profiter de l'occasion pour remercier mes parents pour leur support moral et financier au cours de mes années universitaires et surtout de ces deux dernières années. Je remercie aussi les gens qui m'ont entouré : mon copain Martin, ma sœur et mon frère, mes amies : Claudia, Caroline, Nathalie et Isabelle ainsi que tout ceux avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et qui ont dû m'endurer durant mes deux années de maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|--------|
| SOMMAIRE----- | i |
| REMERCIEMENTS ----- | iii |
| TABLE DES MATIÈRES----- | iv |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS ----- | vii |
| LISTE DES TABLEAUX ----- | ix |
| LISTE DES FIGURES----- | x |
| LISTE DES ANNEXES ----- | xii |
| INTRODUCTION ----- | 1 |
| Généralités sur la gale commune de la pomme de terre et études taxonomiques | |
| des agents causals----- | 1 |
| La gamme d'hôte des agents pathogènes----- | 5 |
| Les mécanismes de virulence des streptomycètes causant la gale commune ----- | 6 |
| Les thaxtomines ----- | 7 |
| Clonage d'un gène de virulence de <i>S. scabies</i> ----- | 10 |
| Les enzymes hydolytiques----- | 11 |
| Les phytohormones ----- | 12 |
| Objectifs----- | 13 |
| CHAPITRE 1-MATÉRIEL ET MÉTHODES----- | 14 |
| 1.1 Souches bactériennes, vecteur et clones ----- | 14 |
| 1.2 Milieux de culture ----- | 15 |
| 1.3 Enzymes et standards de poids moléculaire utilisés ----- | 15 |
| 1.4 Construction d'une banque génomique de <i>S. scabies</i> EF-35 ----- | 16 |
| 1.4.1 Extraction de l'ADN génomique de <i>S. scabies</i> EF-35----- | 16 |

| | | |
|-------|---|----|
| 1.4.2 | Préparation du plasmide pFD666, vecteur utilisé dans la construction de la banque génomique----- | 16 |
| 1.4.3 | Préparation des inserts utilisés pour la construction de la banque génomique ----- | 17 |
| 1.4.4 | Ligation des fragments d'ADN génomique de <i>S. scabies</i> EF-35 et du vecteur pFD666----- | 18 |
| 1.4.5 | Transformation de la banque génomique de <i>S. scabies</i> EF-35 chez <i>E. coli</i> DH10B----- | 18 |
| 1.4.6 | Amplification de la banque génomique de <i>S. scabies</i> EF-35 ----- | 20 |
| 1.4.7 | Transformation de la banque génomique de <i>S. scabies</i> EF-35 chez <i>S. lividans</i> TK-24 ----- | 20 |
| 1.5 | Criblage de la banque génomique de <i>S. scabies</i> EF-35 exprimée chez <i>S. lividans</i> TK-24 ----- | 21 |
| 1.5.1 | Première sélection : étude du pouvoir pathogène des clones sur des plantules de radis poussées en pétri ----- | 21 |
| 1.5.2 | Deuxième sélection : étude du pouvoir pathogène sur les plantules de radis en tube----- | 22 |
| 1.5.3 | Troisième sélection : étude de production de pigments jaunes----- | 23 |
| 1.6 | Caractérisation du clone 2.21 ----- | 24 |
| 1.6.1 | Étude du pouvoir pathogène du clone 2.21 des pommes de terre en croissance ----- | 25 |
| 1.6.2 | Purification d'un pigment jaune (pigment V) produit par le clone 2.21 -- | 25 |
| 1.7 | Comparaison du pigment V et de la thaxtamine A ----- | 26 |
| 1.7.1 | Comparaison entre les spectres U.V. et visible du pigment V et de la thaxtamine A ----- | 26 |
| 1.7.2 | Test de toxicité ----- | 27 |
| 1.8 | Analyse de l'ADN du clone 2.21 ----- | 27 |

| | |
|--|----|
| CHAPITRE II-RÉSULTATS | 30 |
| 2.1 Construction de la banque génomique de <i>S. scabies</i> EF-35 | 30 |
| 2.2 Criblage des clones de la banque géomique | 32 |
| 2.2.1 Première sélection : étude du pouvoir pathogène des clones sur les plantules de radis poussées en pétri | 32 |
| 2.2.2 Deuxième sélection : étude du pouvoir pathogène sur les plantules de radis en tube | 32 |
| 2.2.3 Troisième sélection : étude de la production des pigments jaunes | 34 |
| 2.3 Étude de la toxicité des pigments jaunes | 35 |
| 2.4 Étude du clone 2.21 | 38 |
| 2.4.1 Purification du produit nécrosant sécrété par le clone 2.21 | 39 |
| 2.4.2 Étude de la toxicité sur rondelle de pomme de terre des trois phases récupérées par HPLC | 40 |
| 2.4.3 Étude comparative du pigment V et de la thaxtomine A | 41 |
| 2.4.3.1 Comparaison de la thaxtomine A et du pigment V sécrété par le clone 2.21 par HPLC | 41 |
| 2.4.3.2 Spectre U.V. et visible | 43 |
| 2.5 Étude du pouvoir pathogène du clone 2.21 sur les tubercules de pomme de terre | 43 |
| 2.6 Analyse de l'ADN du clone 2.21 | 47 |
| CHAPITRE III-DISCUSSION | 51 |
| CONCLUSION | 60 |
| ANNEXE | 62 |
| BIBLIOGRAPHIE | 64 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|--------------|---|
| ADN : | acide désoxyribonucléotide |
| ARN : | acide ribonucléotide |
| CIP : | calf intestinal phosphatase |
| cm : | centimètre |
| °C : | degré celcius |
| Ω : | homs |
| ISP : | International Streptomyces Project |
| Kb : | kilobase |
| Kv : | kilovolt |
| L : | litre |
| LB : | Luria broth |
| μl : | microlitre |
| μg : | microgramme |
| μF : | microfarade |
| mM : | millimolaire |
| mm : | millimètre |
| ml : | millilitre |
| mg : | milligramme |
| min : | minute |
| M : | molaire |
| ng : | nanogramme |

nm : **nanomètre**
% : **pourcentage**
rpm : **rotation par minute**
TSA : **Tryptic Soy Agar**
TSB : **Tryptic Soy Broth**
U.V. : **ultraviolet**

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristique des différents clones retenus -----36

Tableau 2. Migration des pigments jaunes des clones 2.21, 9.8, 9.1, 4.17,
de la thaxtomine A et de l'actinorhodine sur TLC-----37

LISTES DES FIGURES

- Figure 1.** Patron de restriction des ADN_s plasmidiques digérés par *Hind*III
provenant de clones de la banque génomique de *S. scabies* EF-35
exprimée chez *E. coli* DH10B -----31
- Figure 2.** Longueur moyenne des plantules de radis ayant poussé en présence
des différents clones, de *S. scabies* EF-35 et de *S. lividans* TK-24 -----34
- Figure 3.** Étude de la toxicité des pigments jaunes produits par le clone 2.21
sur rondelle de pomme de terre-----38
- Figure 4.** Représentation graphique de la séparation des produits composant
la tache jaune ayant des propriétés nécrosantes du clone 2.21-----40
- Figure 5.** Étude de la toxicité des phases I, II et III récupérées par HPLC du clone 2.21
sur rondelle de pomme de terre-----41
- Figure 6.** Détection de la thaxtamine A et du pigment V du clone 2.21 par HPLC -----42
- Figure 7.** Spectre U.V. et visible de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde
de la thaxtamine A -----44
- Figure 8.** Spectre U.V. et visible de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde
du pigment V -----45

| | |
|--|-------|
| Figure 9. Pouvoir pathogène du clone 2.21 , de <i>S. scabies</i> EF-35 et de <i>S. lividans</i> TK-24 sur les tubercules de pomme de terre----- | 46 |
| Figure 10. Patron de restriction de l'ADN total du clone 2.21 digéré par les enzymes <i>Sall</i> , <i>SacI</i> , <i>HindIII</i> , <i>XbaI-DraI</i> et <i>BamHI</i> . ----- | 47 |
| Figure 11. Hybridation entre la sonde de 1,7 Kb provenant du vecteur pFD666 et l'ADN total de <i>S. lividans</i> TK-24 (A), <i>S. lividans</i> TK-24 pFD666 (B) et du clone 2.21(C)----- | 49-50 |

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Structure chimique des thaxtomines produites par *S. scabies*-----62

Annexe 2. Carte du plasmide pFD666 -----63

INTRODUCTION

Généralités sur la gale commune de la pomme de terre et études taxonomiques des agents causals.

La gale commune de la pomme de terre est une maladie très répandue dans le monde. Le Canada (Goyer *et al.* 1996), les États - Unis (Loria *et al.* 1997), l'Afrique du Sud (Loria *et al.* 1997), les pays de l'Europe de l'Est et de l'Ouest (Locci. 1994), l'Australie (Loria *et al.* 1997), la Nouvelle - Zélande (Loria *et al.* 1997), l'Israël (Doering Saad. 1992) et le Japon (Tashihiro *et al.* 1990) sont des pays touchés par cette maladie. Les tubercules affectés par la gale commune sont considérés de moindre qualité ou ne sont pas vendables ce qui cause des dommages économiques importants pour ces pays producteurs de pommes de terre (Loria *et al.* 1997) (Tashihiro *et al.* 1990). Les symptômes de la gale commune sur les tubercules de la pomme de terre sont des lésions nécrosées ou liégeuses, isolées ou coalescentes soit superficielles ou profondes (Loria et Lambert 1989). Les agents responsables de la gale commune sont des bactéries faisant partie de la famille des actinomycètes. Le premier organisme à avoir été identifié et décrit comme agent responsable de cette maladie l'a été au siècle dernier. C'est Thaxter, qui en 1892 fut le premier à isoler l'agent pathogène de la gale commune. Cet agent pathogène fut caractérisé comme étant capable de produire un pigment brun-noir, la mélanine, et des chaînes spiralées de spores grises. Il nomma l'agent pathogène *Oospora scabies*. En 1914, Güssow renomma l'espèce comme étant *Actinomyces scabies* parce que l'agent pathogène était une bactérie filamenteuse de la famille des Actinomycètes et non un champignon comme le pensait Thaxter. Par la suite, Waksman et Henrici renomment l'espèce comme étant *Streptomyces scabies* en 1948. La souche fut perdue et en 1961 Waksman décrit l'espèce à nouveau et suggère que la souche IMRU 3018 soit reconnue comme néotype. Malheureusement, la souche IMRU 3018 ne correspondait pas à la

description originale de *S. scabies* puisqu'elle n'avait pas de chaînes spiralées de spores grises et ne produisait pas de mélanine. Les différences observées entre la description de la souche originale et la souche néotype ont engendré beaucoup de confusion et l'espèce *S. scabies* ne figurait donc plus sur la liste officielle des bactéries. En 1989, la situation a été clarifiée par Lambert et Loria qui ont proposé une nouvelle souche de *S. scabies* comme néotype. Cette souche (ATCC 49173) isolée aux États-Unis produit de la mélanine, a des chaînes de spores spiralées grises et utilise tous les sucres recommandés par l'ISP pour des fins d'identification (International Streptomyces Project ; Shirling and Gottlieb, 1966).

Streptomyces scabies est l'agent pathogène prédominant de la gale commune. Suite à sa caractérisation par Lambert et Loria (1989 a), plusieurs souches de streptomycètes pathogènes possédant un phénotype semblable ont été isolées et associées à l'espèce *S. scabies*. Plusieurs travaux de recherche au niveau génétique ont été faits dans le but d'étudier la diversité de l'espèce. Selon l'analyse des gènes de l'ARN ribosomique 16S, Takeuchi et al (1996) démontrèrent que trois souches de *S. scabies* provenant des États-Unis, d'Hongrie et du Japon avaient des séquences identiques. Des souches isolées de Finlande (Lindholm et al. 1997), de Russie et du Canada (Akimov et al., soumis pour publication) ont des séquences d'ADNr 16S identiques à celles des souches caractérisées par Takeuchi et al. (1996) ou leurs séquences ne diffèrent qu'au niveau d'une ou deux nucléotides. Même si *S. scabies* est l'espèce pathogène prédominante, d'autres travaux ont démontré que d'autres espèces de streptomycètes pouvaient induire la gale commune de la pomme de terre. C'est ainsi que Tashiro et al (1990) divisaient des streptomycètes pathogènes du Japon en deux groupes selon la morphologie des chaînes de spores; spiralées ou légèrement ondulées. Pour clarifier la subdivision, des études d'hybridation ADN-ADN ont été effectuées et les résultats confirmèrent qu'il y avait bien deux groupes génétiquement différents au Japon car le pourcentage de similarité entre les ADNs des deux groupes n'était que de 12%. Healy et Lambert (1991) ont aussi fait des études d'hybridation ADN-ADN avec des souches de *S.*

scabies isolées des États-Unis et du Canada. Ils ont montré qu'il existe une énorme diversité génétique à l'intérieur des bactéries classifiées dans cette espèce, car des résultats aussi bas que 20 % de similarité avec la souche-type ont été obtenus, ce qui laisse penser que malgré des propriétés phénotypiques semblables les bactéries associées à l'espèce *S. scabies* pourraient être subdivisées.

Paradis et *al.* (1994) ont fait une étude similaire sur des bactéries isolées dans l'est du Canada et partageant les mêmes traits phénotypiques que *S. scabies*. La voie résultante de cette étude est que l'ensemble de ces bactéries se divise en deux groupes génétiques distincts de micro-organismes. Les bactéries des deux groupes génétiques se distinguent également au niveau de la séquence de leur ADNr 16S ; les bactéries d'un des deux groupes étant toujours identiques à *S. scabies* en regard de ce caractère (Akimov., communication personnelle). Ainsi, Paradis et *al.* (1994) viennent appuyer Healy et Lambert (1991) en proposant que *S. scabies* montre plus de diversité qu'une espèce conventionnelle.

Les souches des études précédentes qui se distinguent de *S. scabies* au niveau génétique n'ont toujours pas été associées à une espèce; leur identité taxonomique demeure inconnue. Cependant, il existe des souches d'espèces validement décrites et différentes de *S. scabies* qui causent aussi la gale commune. C'est le cas d'une espèce tolérante à l'acidité et qui a été caractérisée en 1989 (b) par Loria et Lambert. Ils ont proposé le nom de *S. acidiscabies* pour ces souches acidotolérantes et la souche ATCC 49003 est proposée comme souche-type. *S. acidiscabies* fut isolée pour la première fois par Bonde et McIntyre en 1968 et plus tard par Manzer et *al.* en 1977. Ils trouvèrent des différences morphologiques entre *S. scabies* et *S. acidiscabies*. Contrairement à *S. scabies*, *S. acidiscabies* est caractérisée comme étant tolérante à l'acidité et produisant des chaînes de spores ondulées. La couleur des spores de *S. acidiscabies* varie de blanc à orangé selon le milieu de croissance. *S. acidiscabies* ne produit

pas de mélanine, mais produit un pigment sensible au pH ; (rouge → à pH supérieur à 8,3 et jaune ← à pH inférieur à 8,3) et diffusible dans le milieu. *S. acidiscabies* utilise tous les sucres de l'ISP (Shirling and Gottlieb, 1966) à l'exception du raffinose. Le taux de similarité ADN-ADN entre *S. scabies* et *S. acidiscabies* ne dépasse pas 20%, ce qui indique que ce sont deux espèces distinctes. La maladie causée par *S. acidiscabies* est communément appelée la gale acide. Les symptômes sont similaires à ceux causés par *S. scabies* (Goyer et al. 1996).

Une espèce de streptomycètes causant des lésions profondes de gale commune et retrouvée souvent dans les sols irrigués a été isolée du Québec par Faucher et al. en 1992. En 1996, Goyer et al. proposaient de nommer et de caractériser cette nouvelle espèce *Streptomyces caviscabies* et proposaient la souche ATCC 51928 comme souche-type. Cette espèce est phénotypiquement différente de *S. scabies* et de *S. acidiscabies*. *S. caviscabies* est caractérisée comme ayant un mycélium brun-or sur milieu YME (Pridham et al., 1956-1957) et produit des chaînes ondulées de spores blanches. Elle ne produit pas de mélanine et utilise seulement, parmi les huit sucres de l'ISP, le raffinose comme source de carbone. Sa croissance est inhibée à partir d'un pH inférieur à 4,5. Le taux de similarité ADN-ADN entre *S. caviscabies* et les souches-types de *S. scabies* et *S. acidiscabies* est de 24 %.

Au Japon, depuis 1996 des cas de gale commune sont fréquents dans l'est de Hokkaido. Cependant, l'agent pathogène isolé semble différer de *S. scabies*, *S. acidiscabies* et de *S. caviscabies*. S'il présente des chaînes de spores grises et ondulées, il ne produit aucun pigment diffusible. Suite au test d'hybridation ADN-ADN, il a été démontré que le taux de similarité entre ces souches japonaises et les souches des autres espèces connues causant la gale commune était faible. Miyajima et al. (1998) ont caractérisé ce nouvel agent phytopathogène et ont soumis le nom de *Streptomyces turgidiscabies*, la souche-type étant ATCC 700248. Outre *S. scabies*, il y a donc trois autres espèces pathogènes qui causent la

gale commune et qui ont été validement identifiées: *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* et *S. caviscabies*.

La gamme d'hôte des agents pathogènes.

En plus de la pomme de terre, la gale commune affecte aussi des cultures maraîchères à racines pivotantes (Locci, 1994 ; Goyer *et al.* 1996 ; Loria *et al.* 1997). La carotte, la betterave, le panais et le radis en sont des exemples. Déjà en 1949, Hooker était le premier à documenter que *S. scabies* pouvait être virulent sur une autre plante que la pomme de terre, en occurrence le radis. Levick *et al.* (1984) rapporte que la gale commune du radis pouvait causer des dommages importants dans plusieurs régions productrices. Suite à l'isolement d'agents pathogènes des lésions du radis, une étude morphologique indiquait que c'étaient des *Streptomyces*. Des streptomycètes phytopathogènes ont également été isolés d'autres types de racines telles la carotte (Janse, 1988; Goyer et Beaulieu, 1997). Dans la plupart de ces études, les agents pathogènes n'ont pas été identifiés au niveau de l'espèce ou ont été associés à *S. scabies*. Une étude sur la gamme d'hôtes de *S. scabies*, *S. caviscabies* et de *S. acidiscabies* a été menée pour la première fois par Goyer *et al.* en 1997. Les auteurs ont démontré que même si la gamme d'hôte entre deux souches d'une même espèce pouvait varier, le pouvoir pathogène des trois espèces (*S. scabies*, *S. acidiscabies* et *S. caviscabies*) ne se limitait pas à la pomme de terre. Sur les racines pivotantes telles la carotte, la betterave, le panais et le radis, les symptômes causés par *S. scabies*, *S. caviscabies* et *S. acidiscabies* s'apparentent aux symptômes que ces espèces causent sur les tubercules de pommes de terre soit des lésions liégeuses plus ou moins profondes.

En 1996, Liener *et al.* font une découverte intéressante en démontrant que *S. scabies* ne cause pas uniquement des symptômes de gale commune. Si cette bactérie est inoculée sur des graines de monocotylédones et de dicotylédones, *S. scabies* inhibe la croissance des plantules germantes et pouvait même provoquer leur mort. Il causait une hypertrophie au niveau des cellules suivie d'une nécrose et de l'affaissement autour de site d'infection.

La diversité taxonomique des agents causant la gale commune et la vaste gamme d'hôte des agents pathogènes soulèvent des questions intéressantes sur les mécanismes de virulence des streptomycètes causant la gale commune.

Les mécanismes de virulence des streptomycètes causant la gale commune.

Les mécanismes de virulence associés aux streptomycètes pathogènes commencent tout juste à être éclaircis. Habituellement, une bactérie phytopathogène possède plusieurs mécanismes de virulence et l'addition de ces mécanismes lui confère son pouvoir pathogène. Les mécanismes de virulence permettant aux bactéries d'induire des symptômes à la plante hôte sont nombreux mais les plus communs sont: la production de phytotoxines, la sécrétion d'enzymes hydrolytiques et/ou de phytohormones.

Les thaxtomines

King *et al.* en 1989 isolaient pour la première fois des phytotoxines accumulées dans des lésions de pommes de terre infectées par *S. scabies*. Lawrence *et al.* (1990) démontraient qu'en appliquant ces phytotoxines extraites des lésions de pommes de terre sur des tubercules stériles, les symptômes de la gale commune étaient reproductibles. King *et al.* caractérisaient en 1992 la structure chimique de deux composés phytotoxiques et leurs donnaient les noms de thaxtomines A et B. Le composé majeur était la thaxtamine A et le composé mineur la thaxtamine B. La structure chimique des thaxtomines A et B est une combinaison de deux acides aminés modifiés et N-méthylés : l' α -hydroxy-*m*-tyrosine et le 4-nitrotryptophane pour la thaxtamine A et l' α -hydroxyphénylalanine et le 4-nitrotryptophane pour la thaxtamine B (voir annexe 1). En 1996, King *et al.* avaient caractérisé au total 10 thaxtomines incluant la A et la B. Parmi ces autres thaxtomines, certaines seraient des intermédiaires dans la voie de synthèse de la thaxtamine A et d'autres seraient des produits d'oxydation de la thaxtamine A. Une autre recherche faite par King *et al.* (1992) démontre que le groupement nitro sur l'anneau du tryptophane et la configuration L-L de l'anneau dicétopipérazine sont essentiels et représentent la structure minimale pour que les thaxtomines aient un effet toxique sur les plantes.

Si King *et al.* (1989 a) furent les premiers à démontrer la production *in vivo* de thaxtomines sur des tubercules de pomme de terre par *S. scabies*, Babcock *et al.* (1993) ont montré que *S. scabies* peut produire les thaxtomines *in vitro* dans un milieu à base de gruau. Ils ont aussi démontré aussi que *S. scabies* se met à sécréter les thaxtomines à la fin de la phase exponentielle de croissance, suggérant que les thaxtomines sont des métabolites secondaires.

La thaxtomine A, la phytotoxine sécrétée en plus grande abondance semble être un facteur de virulence très important dans le pouvoir pathogène de la bactérie. King *et al.* (1991) ont démontré qu'il existait une corrélation entre le pouvoir pathogène de *S. scabies* et la production de la thaxtomine A. Toutes les souches testées de *S. scabies* induisant de la nécrose sur des tranches de pomme de terre ont produit de la thaxtomine A. Loria *et al.* (1995) ont étudié différentes souches de *S. scabies* et ont observé que le degré de virulence de ces souches était différent. Ils ont également étudié le taux de production de la thaxtomine A, et montré que le taux de production de la thaxtomine A était différent d'une souche à l'autre. Ainsi, ils suggèrent que les différents degrés de virulence s'expliquent par la différence au niveau de la production de la thaxtomine A. Les souches causant les symptômes les plus sévères auraient un plus haut taux de production de thaxtomine A.

L'importance de la thaxtomine dans le pouvoir pathogène de *S. scabies* est aussi supportée par les travaux de Leiner *et al.* (1996). Ces auteurs ont démontré qu'en appliquant directement de la thaxtomine A sur les plantules de radis, les symptômes produits sont similaires à ceux causés par *S. scabies*. Ces symptômes sont une réduction de la croissance des tiges et des racines des jeunes plantules de radis et l'apparition de nécroses sur les tissus de la plantule. Ils mentionnent aussi que le radis est affecté à partir d'une concentration de 10 μM de thaxtomine A. De plus, ils ont comparé l'agressivité des souches de *S. scabies* sur les tubercules de pomme de terre, sur les plantules de radis et le taux de production de la thaxtomine A. Les souches s'avérant les plus agressives sur les tubercules de pomme de terre l'ont aussi été sur les plantules de radis et produisaient plus de thaxtomine A que les souches les moins agressives. Ceci soutient la corrélation entre le pouvoir pathogène et la production de la thaxtomine A, et aussi le degré d'agressivité qui est proportionnel à la quantité de thaxtomine A sécrétée. La thaxtomine A agit non seulement sur les tubercules de pomme de terre et sur les plantules de radis mais elle induit également des symptômes lorsqu'elle est appliquée sur des feuilles de tomate ou de framboisier (Goyer. 1997), ce qui montre qu'elle

est une toxine non-spécifique et qu'elle doit interagir avec une cible universelle des cellules des plantes.

Ce sont les travaux de recherche menés par Goyer *et al.* (1998) qui ont prouvé que la thaxtomine A était un facteur de virulence essentiel pour le pouvoir pathogène de *S. scabies*. Une série de mutants de *S. scabies* affectés dans leur production de thaxtomine A a été obtenue suite à une mutagénèse chimique. Trois types de mutants ont été obtenus: des mutants produisant de 2 à 20 fois moins de thaxtomine A que la souche sauvage, un mutant produisant 300 fois moins de thaxtomine A et un mutant ne produisant plus aucune quantité détectable de thaxtomine A. Des études de pouvoir pathogène sur les tubercules de la pomme de terre et sur les plantules de radis ont été effectuées avec ces mutants. Encore une fois, la corrélation était supportée. Les mutants produisant entre 2 et 20 fois moins de thaxtomine A que la souche sauvage avaient une agressivité réduite sur les plantules de radis et sur les tubercules de pomme de terre par rapport à la souche sauvage. Les mutants produisant 300 fois moins de thaxtomine A que la souche sauvage ou ne produisant que des quantités non détectables de thaxtomine A perdaient leur pouvoir pathogène. Cependant, pour ce qui est du degré d'agressivité par rapport à la quantité de thaxtomine A sécrétée, la relation trouvée n'était pas parfaite. Ainsi le mutant M8 qui produisait environ trois fois plus de thaxtomine A que les mutants M1 et M19 était moins virulent sur les plantules de radis.

S. acidiscabies, *S. caviscabies* et *S. turgidiscabies* sécrètent tous les thaxtomines en présence des tubercules de pomme de terre *in vivo*. *In vitro*, *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* en produisent dans les milieux à base de gruau, de pelures de pomme de terre et de pomme de terre douce et dans un milieu pomme de terre. Tandis que *S. caviscabies* n'en produit seulement en présence de milieu pelures de pomme de terre et de pomme de terre douce.

Clonage d'un gène de virulence de *S. scabies*

Un gène codant pour un facteur de virulence de *S. scabies* a été cloné par Bukhalid et al. (1997). Ils ont cloné un fragment d'ADN génomique de 9,4 Kb provenant de *S. scabies* ATCC 49173 dans *S. lividans* TK24 qui conférait à la souche recombinante la propriété d'induire de la nécrose sur des tranches de pomme de terre. Suite à des travaux de sous-clonage, ils ont démontré que le plus petit fragment actif avait une taille de 0,67 Kb. Ce fragment de 0,67 Kb permet la sécrétion par la souche recombinante d'un composé extracellulaire, incolore, soluble dans l'eau et capable d'induire une nécrose sur les tissus de tubercules de pomme de terre. Les nécroses causées par ce composé sont semblables à celles causées par *S. scabies*. Le fragment de 0,67 Kb a été désigné comme étant le gène *nec1*. Le contenu en guanine et cytosine de ce gène est relativement bas pour un streptomycète, soit de 54 %. Le gène *nec1* est bordé par un pseudogène de transposition, l'ORF *tnp* (cadre de lecture ouvert) en 5'. Étant donné la proximité entre l'ORF *tnp* et de *nec1*, ils proposent que *S. scabies* aurait pu acquérir ce gène par le biais d'éléments génétiques mobiles comme un plasmide ou un transposon conjugatif. De plus, suite à des études d'hybridation avec le gène *nec1*, il a été démontré que toutes les souches de *S. scabies*, *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* pathogènes (Bukhalid et al. 1998) à l'exception d'une souche provenant d'Afrique possédaient ce gène. Les auteurs supposent aussi que le gène *nec1* serait lié physiquement à ceux de la biosynthèse de la thaxtomine A, car toutes les souches possédant le gène *nec1* produisent aussi de la thaxtomine A. Cette hypothèse n'est toutefois pas supportée par une autre évidence. Le produit toxique codé par *nec1* a des propriétés physico-chimiques très différentes de la thaxtomine A. Le produit du gène *nec1* est soluble dans l'eau et incolore contrairement à la thaxtomine A qui est peu soluble dans l'eau et jaune.

Les enzymes hydrolytiques

Le rôle des enzymes hydrolytiques dans le mécanisme de virulence des *Streptomyces* phytopathogènes a été peu étudié. Toutefois, Hale *et al.* (1992), rapportent que l'infection causée par *S. scabies* résulte en une prolifération de la subérine et ce au niveau de la lésion sur le tubercule de la pomme de terre. La subérine est un polymère composé de longues chaînes de polyesters d'acides gras et de composés phénoliques liés aux chaînes lipidiques par des liens esters et éthers. La plante produit cette couche de subérine pour créer une barrière contre les pertes d'eau et contre les infections des agents pathogènes. Hale *et al.* (1992) ont isolé et caractérisé une estérase, une enzyme extracellulaire sécrétée par *S. scabies* souche FL1 pathogène. Cette enzyme dégrade la subérine et l'on peut supposer que du coup elle faciliterait la pénétration de la bactérie phytopathogène à travers cette barrière physique. Fett *et al.* (1994), Hale *et al.* (1992) et Beauséjour *et al.* (1999) démontrent que d'autres souches pathogènes de *S. scabies* et de *S. acidiscabies* sont capables de sécréter une estérase hydrolysant la subérine. Si le rôle de l'estérase dans le mécanisme de virulence des streptomycètes phytopathogènes reste à confirmer, les récents travaux de Beauséjour *et al.* (sous presse) apportent une évidence supplémentaire supportant l'importance de cette enzyme dans le pouvoir pathogène de *S. scabies*. Ces auteurs ont testé différents composés végétaux en regard de leur capacité à induire la production de thaxtamine A *in vitro* par différentes souches de *S. scabies*. Parmi les composés végétaux testés, le seul qui a permis la production de thaxtamine A dans un milieu minimal était la subérine. La subérine agirait donc soit comme un précurseur de synthèse de la thaxtamine A, soit comme un inducteur des gènes de biosynthèse de la thaxtamine A. Considérant les structures chimiques de la thaxtamine et de la subérine, la seconde hypothèse semble la plus plausible. Étant donné la complexité structurale de la subérine, ce n'est vraisemblablement pas le polymère lui-même qui agirait comme inducteur des gènes de biosynthèse de la thaxtamine A mais un de ses produits de dégradation. Le rôle de l'estérase dans le pouvoir pathogène de *S. scabies* pourrait donc être

double en 1) facilitant l'entrée de l'agent pathogène dans les tissus végétaux et en 2) permettant suite à son action sur la subérine le relâchement de composés agissant comme inducteurs des gènes de biosynthèse de la thaxtomine A. D'autres enzymes extracellulaires pouvant dégrader les tissus végétaux produits par *S. scabies* et *S. caviscabies* ont été rapportées telles les pectinases, cellulases, lipases et protéases, mais leur rôle dans le pouvoir pathogène n'a pas encore été étudié (Paradis *et al.* 1994).

Les phytohormones

La production de la phytohormone acide 3-indole acétique (auxine) par *S. scabies* a été rapportée par Hooker en 1981. L'acide 3-indole acétique pourrait être impliqué dans le mécanisme de virulence de cet agent pathogène, car Lapwood *et al.* en 1973 observèrent que le développement des lésions de la gale commune était accompagné d'une division cellulaire au niveau des tissus des lésions. En 1994, Manulis *et al.* ont démontré qu'une souche de *S. scabies* produisait l'acide 3-indole acétique dans un milieu de culture lorsqu'il était supplémenté de L-tryptophane. Cette phytohormone végétale a pour fonction de stimuler l'élongation et la différenciation cellulaire. Elle affecte aussi la perméabilité des membranes cellulaires. Il est rapporté que le fait d'augmenter la quantité d'acide 3-indole acétique, augmente la plasticité de la membrane de la plante, rendant ainsi les protéines composantes de la membrane plus accessibles pour la dégradation par les enzymes extracellulaires du pathogène. Le rôle de l'auxine dans le pouvoir pathogène de *S. scabies* reste à élucider.

Objectifs

Le but de cette recherche est d'identifier de nouvelles régions génétiques impliquées dans le pouvoir pathogène de *S. scabies*. Pour réaliser ce but, les objectifs suivants ont été fixés: 1) la construction d'une banque génomique de *S. scabies* souche EF-35, 2) la transformation des clones de la banque génomique dans un hôte hétérologue, *S. lividans* TK-24, 3) l'analyse du pouvoir pathogène des colonies recombinantes sur les plantules de radis et la caractérisation partielle des clones affectant la croissance des radis.

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1-Souches bactériennes, vecteur et clones

La souche de *S. scabies* EF-35 a été isolée par Faucher *et al.* (1992) à partir d'un tubercule de pomme de terre présentant des symptômes de gale commune. Cette souche est pathogène, synthétise de la thaxtomine A et est capable d'induire les symptômes de gale commune. *S. lividans* TK-24 a été utilisée comme souche d'expression de la banque génomique de *S. scabies* EF-35. TK24 est non-pathogène et ne synthétise pas de thaxtomines. La souche *Escherichia coli* DH10B a aussi été utilisée pour les travaux de clonage. Le vecteur navette pFD666 construit par Denis et Brzezinski (1992) a été employé pour la construction de la banque génomique de *S. scabies* EF-35. Ce vecteur possède deux origines de réplication: l'une pour se répliquer chez *E. coli* et l'autre chez les actinomycètes. Ce vecteur est pourvu d'un gène de résistance à la néomycine qui est exprimé dans les deux organismes. Les clones 2.21, 9.1, 9.8, 4.17, 13.34, 15.5, 15.38, 5.40, 1.41, 10.1 et 5.37 sont des dérivés de TK24 qui ont été transformés par le vecteur pFD666 porteur d'inserts d'ADN provenant de *S. scabies* EF35.

1.2-Milieux de culture

Les souches d'actinomycètes étaient propagées sur les milieux solides YME (Pridham et *al.*, 1956-1957) ou TSB (Difco). Lors des cultures en milieu liquide, ces souches étaient propagées dans les milieux TSB, YGM⁺ (King et *al.*, 1992), YME (Pridham et *al.*, 1956-1957), YEME (Hopwood et *al.*, 1985) ou le bouillon son d'avoine (Goyer et *al.*, 1998) dépendant du type d'expérimentation (voir sections 2.4.1 à 2.10). Les souches recombinantes ont été conservées et multipliées dans les mêmes milieux supplémentés de kanamycine à 50 µg par ml. *E. coli* DH10B a été propagé sur les milieux liquides ou solides LB.

1.3-Enzymes et standards de poids moléculaire utilisés

Les enzymes utilisées lors des digestions de l'ADN provenaient de Pharmacia. Celles employées pour les modifications de l'ADN ont été obtenues de Promega. L'usage de tous les enzymes s'est fait selon les directives des manufacturiers. Le lysozyme et la pronase ont été fournis par Sigma. Les standards d'ADN de différentes tailles provenaient de différentes compagnies (Pharmacia, Gibco et Bio-Rad).

1.4-Construction d'une banque génomique de *S. scabies* EF-35

1.4.1-Extraction de l'ADN génomique de *S. scabies* EF-35

L'ADN génomique de *Streptomyces scabies* EF-35 a été extrait selon la méthode décrite par Hopwood et *al.* (1985). L'extraction de l'ADN génomique s'est faite à partir d'une culture de 50 ml de milieu TSB et poussée à une température de 30°C, sous agitation orbitale (350 rpm) et âgée de 24 à 48 heures. Une partie de l'ADN extrait a été chargée dans un gel d'agarose 0,8% dans du tampon TBE (89 mM de Tris base, 89 µl d'acide borique et 2 mM d'EDTA) pour subir une électrophorèse à 80 mA pendant 1 heure dans un tampon de migration TBE. L'ADN du gel a été photographié sous illumination ultraviolette. La concentration de l'ADN génomique a été estimée par la méthode de pétri d'agarose avec bromure d'éthidium décrite par Sambrook et *al.* (1989).

1.4.2-Préparation du plasmide pFD666, vecteur utilisé dans la construction de la banque génomique

Le plasmide pFD666 qui a servi de vecteur de clonage a été extrait d'*E. coli* DH10B selon la méthode de Maniatis et *al.* (1989). L'extraction s'est faite à partir d'une culture de 100 ml dans le milieu LB supplémenté de kanamycine. La culture a subi une agitation rotative (350 rpm) à la température de 37 °C pour toute une nuit. La quantité d'ADN obtenue a été estimée comme décrit précédemment (voir section 1.4.1). Le vecteur pFD666 a été digéré totalement par une enzyme de restriction. La digestion totale comprenait 20 µg d'ADN plasmidique et 75 unités de l'enzyme *Bam*HI dans 500 µl de tampon "one for all".

La réaction s'est faite à 37 °C pendant 5 heures. Une partie de l'échantillon a été chargée dans les puits d'un gel d'agarose 0,8% dans du tampon TBE pour observer si l'ADN plasmidique avait été linéarisé (voir section 1.4.1). La digestion complétée, la solution d'ADN subissait deux extractions au phénol-chloroforme avant d'être précipitée en présence d'éthanol absolu (un ajout d'éthanol de 2,5 fois le volume de la solution d'ADN) et 3 M d'acétate de sodium à pH 5,2 (un ajout de 1/10 du volume de la solution d'ADN) (Maniatis et *al.*, 1989). L'ADN plasmidique était alors resuspendu dans le plus petit volume d'eau distillée possible et sa concentration était estimée par la méthode sur pètri d'agarose (voir section 1.4.1). Le vecteur linéaire a ensuite été modifié au niveau de ses extrémités. Une déphosphorylation des extrémités 5' a été effectuée en utilisant la CIP de Promega. Au total, 12 µg d'ADN plasmidique linéaire et 1 unité de CIP étaient ajoutés à 100 µl de tampon de réaction (fourni par le manufacturier). Après une incubation de 30 minutes à 37 °C, l'enzyme subissait une inactivation par la chaleur à 75 °C pendant 15 minutes. L'ADN plasmidique a ensuite été extrait deux fois au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol comme décrit précédemment. De plus, une estimation de la concentration a été faite suite à la resuspension de cet ADN dans un volume minimal d'eau distillée toujours par le méthode de pètri d'agarose (voir section 1.4.1).

1.4.3-Préparation des inserts utilisés pour la construction de la banque génomique

Une digestion partielle de l'ADN génomique de *S. scabies* EF-35 a été effectuée par une enzyme de restriction de type endonucléase. Des fragments de 15 à 20 Kb étaient recherchés. La digestion partielle s'est faite sur 8 µg d'ADN génomique dans un volume total de 100 µl de tampon "one for all" et 15 unités de l'enzyme *Bgl*II ont été ajoutés. L'efficacité de la digestion a été évaluée sur un gel d'agarose selon le protocole décrit à la section 1.4.1. Lorsque la qualité de la digestion était adéquate, l'ADN digéré subissait

deux extractions au phénol-chloroforme et était précipité en présence d'éthanol absolu et d'acétate de sodium comme décrit à la section 1.4.2. Une estimation de la concentration des fragments de l'ADN génomique a été effectuée encore une fois par la méthode de pétri d'agarose mentionnée précédemment (voir section 1.4.1.).

1.4.4-Ligation des fragments d'ADN génomique de *S. scabies* EF-35 et du vecteur pFD666

Une ligation entre l'ADN plasmidique et les fragments d'ADN génomique de *S. scabies* EF-35 a été réalisée dans un rapport de 1:3. La quantité totale d'ADN impliquée dans la réaction de ligation était de 300 ng, soit 75 ng d'ADN plasmidique digéré et déphosphorylé (voir section 1.4.2) et 225 ng d'ADN génomique de *S. scabies* EF-35 digéré (voir section 1.4.3). À ce 300 ng d'ADN, ont été ajoutés la ligase (3 unités) et l'ATP à 1 mM et dans 20 µl de tampon de ligation. La ligation s'est déroulée toute la nuit à 15 °C.

1.4.5-Transformation de la banque génomique de *S. scabies* EF-35 chez *E. coli* DH10B

Les cellules de *E. coli* DH10B ont subi une procédure leur permettant une pénétration d'ADN exogène présent dans leur environnement. La méthode suivie est celle du manufacturier BIO-RAD. *E. coli* DH10B a été cultivé dans 200 ml de milieu LB sous agitation (350 rpm) à 37 °C jusqu'à l'obtention par la culture d'une densité optique atteignant entre 0,5 et 0,7 à une longueur d'onde de 600 nm. Les cellules ont alors été placées sur la glace pour 15 minutes. Par la suite, les cellules ont subi une centrifugation à

10 000 rpm de 10 minutes dans un rotor froid. Le culot de cellules a été lavé trois fois avec respectivement 200 ml, 100 ml puis 4 ml de glycérol 10% froid. Les cellules ont finalement été resuspendues dans 0,5 ml de glycérol 10% froid et distribuées dans des éppendorfs stériles en volume de 40 µl et congelées dans la glace sèche. Les cellules ont alors été conservées à - 70 °C.

Les cellules compétentes de *E. coli* DH10B ont subi une électroporation, c'est-à-dire qu'elles ont reçu un courant électrique formant ainsi des pores au niveau de leur membrane cellulaire par lesquels l'ADN exogène peut pénétrer. La procédure pour électroporer ces cellules était celle fournie par le manufacturier BIO-RAD avec quelques modifications. Les cellules ont été électroporées avec le plasmide pFD666 portant des inserts provenant de l'ADN génomique de *S. scabies* (voir section 1.4.4). Avant l'électroporation, les molécules d'ADN ont été précipitées à l'éthanol et resuspendues dans 15 µl d'eau. Quatre vingt ηg d'ADN ont été ajoutés à la suspension de cellules compétentes préalablement décongelées sur glace. Ensuite, ces cellules ont été transférées dans une cuvette à électroporation de 0,2 cm, puis ont subi un choc électrique de 2,50 Kv. Le " Gene Pulser " était réglé à 25 µF et le " Pulse Controller " à 200 Ω. Immédiatement après le choc, 1 ml de milieu liquide SOC a été ajouté aux cellules puis le tout a été transféré dans un tube de 15 ml pour une incubation de 390 minutes à 30 °C. Une fois l'incubation terminée, les cellules étaient étalées sur des pétris LB supplémentés de kanamycine et incubés à 30 °C pour une journée.

Une estimation du nombre de colonies de *E. coli* DH10B possédant un vecteur porteur d'un fragment d'ADN génomique de *S. scabies* EF-35 a été faite en extrayant les plasmides des colonies s'étant développées en présence de kanamycine par la méthode de la lyse alcaline. Le protocole utilisé était celui de Sambrook et *al.* (1989). Quarante

colonies ont été évaluées. Chacun des ADNs plasmidiques extraits a été chargé dans un gel d'agarose 0,8 % dans du tampon TBE. Les conditions d'électrophorèse sont les mêmes que celles décrites à la section 1.4.1.

1.4.6.-Amplification de la banque génomique de *S. scabies* EF-35

Une fois la banque génomique de *S. scabies* EF-35 construite, celle-ci a été amplifiée en faisant croître les cellules de *E. coli* DH10B transformées dans le milieu de croissance liquide LB supplémenté de kanamycine. Environ 1500 colonies ont été récoltées en ajoutant 1 ml de milieu LB sur les boîtes de pétri et en détachant les cellules du milieu solide grâce à une tige de verre. Les cellules récoltées ont été ajoutées dans 50 ml de milieu LB et ont été incubées pendant 150 minutes, sous agitation (350 rpm) à 30 °C. Une extraction de l'ADN plasmidique de ces cellules a été faite selon la méthode de Maniatis et *al.* (1989). La concentration de l'ADN plasmidique a été estimée selon la méthode de pétri d'agarose (voir section 1.4.1).

1.4.7-Transformation de la banque génomique de *S. scabies* EF-35 chez *S. lividans* TK-24

La souche de *S. lividans* TK-24 a été choisie comme hôte hétérologue pour exprimer la banque génomique de *S. scabies* EF-35. Des protoplastes de cette souche ont été préparés selon le protocole de Hopwood et *al.* (1985) avec une modification. Lors de la dernière resuspension des protoplastes, 2,5 ml de tampon P ont été ajoutés. Les protoplastes ont été distribués en volume de 100 µl à une concentration de 4×10^9 protoplastes par ml. La méthode employée pour transformer ces protoplastes est la suivante. Les protoplastes d'un

eppendorf ont été décongelés, 1.6 µg d'ADN de la banque génomique de *S. scabies* EF-35 ont été ajoutés à l'eppendorf contenant 4×10^9 protoplastes par ml. Les protoplastes et l'ADN ont été mélangés délicatement et 200 µl de tampon T-PEG1000 (Hopwood et *al.* 1985) ont ensuite été ajoutés à ce mélange. Encore une fois un léger brassage a été effectué avant l'étalement de 35 µl par pétri de régénération R2YE à l'aide d'une baguette d'étalement. Tous les pétris de régénération ont été incubés à 30 °C pendant 20 heures. De l'agar mou TSA supplémenté de kanamycine a été appliqué à la surface de chaque pétri de régénération pour sélectionner les clones. Ceux ayant poussé à la surface de l'agar mou après 4 jours ont été repiqués sur pétris YME (Pridham et *al.*, 1956-1957) toujours supplémentés de kanamycine. Au total, 1500 clones ont été repiqués.

1.5-Criblage de la banque génomique de *S. scabies* EF-35 exprimée chez *S. lividans* TK-24

1.5.1-Première sélection: étude du pouvoir pathogène des clones sur des plantules de radis poussées en pétri

La méthode utilisée pour l'étude du pouvoir pathogène des clones sur des plantules de radis cultivar Cherry Belle a été inspirée des travaux de Leiner et *al.* (1993). Le test consiste à faire pousser de jeunes plantules de radis en présence de chacun des clones et de vérifier l'effet des différents clones sur la croissance du radis. Avant de tester l'effet des clones, les plantules de radis sont préparées. Pour ce faire, des graines de radis ayant été désinfectées pendant 5 minutes dans le NaOCl à 0,5% puis rincées 3 fois dans l'eau distillée stérile pendant 5 minutes ont été mises à germer pendant 24 heures sur pétri contenant 1,5% d'agar. Les différents clones de la banque génomique ont été striés à la

surface de pétris contenant 1 % d'agar et 80 µg/ml de kanamycine et ont été incubés 2 jours, à l'obscurité à 30 °C. Après deux jours, les clones présentaient une très faible croissance sur pétri. Les jeunes plantules ayant germé ont alors été déposées à la surface du mycélium de chacun des clones ayant poussé sur pétri. Les pétris contenant les bactéries et les radis ont été incubés 4 jours dans une chambre de croissance ajustée à 24°C et avec une période de luminosité de 12 heures. Les clones qui se distinguaient de TK-24 parce qu'ils semblaient causer un effet d'inhibition de croissance, de nécrose ou d'anomalie de croissance des plantules de radis ont été retenus. Un total de 46 clones sur les 607 testés ont été conservés. Ceux-ci ont subi les deuxièmes et troisièmes tests de criblage suivant.

1.5.2-Deuxième sélection: étude du pouvoir pathogène sur les plantules de radis en tube.

Comme le premier criblage n'avait été fait que sur une seule plantule, il se pouvait que certains des clones retenus n'avaient pas vraiment eu d'effet sur la croissance du radis et que ce soit le hasard qui explique le développement anormal des plantules de radis qui leur étaient associées. Les 46 clones retenus, ont donc subi un deuxième criblage qui consistait à l'étude du pouvoir pathogène sur des plantules de radis cultivar Cherry Belle en tube. Le test en tube permet une meilleure croissance des radis et facilite l'interprétation des résultats. La procédure utilisée a été celle de Leiner et *al.* (1996) avec quelques modifications. Les plantules de radis à tester ont été germées comme précédemment (voir section 1.5.1). Les plantules germées ont été déposées dans un tube de verre de 25 mm de diamètre contenant 20 ml d'agar à 1 %. Les 46 bactéries recombinantes ont été propagées dans un milieu liquide TSB en présence de kanamycine pendant 32 heures à 30 °C sous agitation (350 rpm). Par la suite, les bactéries ont subi une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes et le volume des culots a été mesuré. Un ajout de milieu TSB liquide

a été fait en fonction du volume des culots pour avoir la même concentration de bactéries (3,5 ml de culot de bactéries : 17,5 ml de milieu TSB). Cent vingt cinq µl de culture étaient ajoutés sur le plantule de radis. Après 6 jours de croissance en présence des différents clones, la longueur totale de chaque plantule a été mesurée et comparée à des témoins inoculés avec *S. scabies* EF-35 et *S. lividans* TK-24. Le test s'est fait en 10 répétitions.

1.5.3-Troisième sélection: étude de production de pigments jaunes

Chacun des 46 clones retenus après la première sélection a été testé pour la production de pigment(s) jaune(s). Les thaxtomines étant jaunes, ce test pouvait permettre de sélectionner des clones producteurs de ces phytotoxines. La procédure employée est celle de King et Lawrence (1996) à l'exception de quelques modifications. Les clones étaient inoculés avec une bouclée de spores directement dans 50 ml de milieu liquide son d'avoine sous agitation (350 rpm), à 30 °C pendant 6 jours. Le surnageant de culture était par la suite extrait à l'aide de 25 ml d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décantation. La phase organique était récupérée et le solvant était évaporé sous la hotte. Les composés extraits ont été appliqués sur une plaque de silice 60F 254 de 0,5 mm (VWR Canlab) pour subir une chromatographie sur couche mince. Les solvants utilisés pour la chromatographie étaient un mélange de 90 % de chloroforme et de 10 % de méthanol. La thaxtomine A et l'actinorhodine (pigment sécrété par *S. lividans* TK-24) ont été ajoutées sur les plaques de chromatographie comme témoins de migration. Quatre clones ont été sélectionnés pour la production de pigments jaunes. Les pigments jaunes produits par ces clones ont été grattés des plaques de silice et élués de la silice par une dissolution des pigments dans un mélange de solvants composé de 70% de méthanol et de 30% de chloroforme. Les pigments séchés ont été récupérés après s'être débarrassé des solvants à

l'aide d'un évaporateur. Chacun des pigments ainsi obtenus a été appliqué sur des disques de pomme de terre dans le but de déceler si certains d'entre eux pouvaient avoir un effet toxique sur les tissus végétaux. La méthode suivie est celle de Loria et *al.* (1995) avec les précisions suivantes. Les pommes de terre pelées sont désinfectées pendant 10 minutes dans le NaOCl à 0,5 %, deux lavages de 15 minutes dans l'eau distillée ont suivi. Des disques de 0,5 cm de diamètre ont été coupés à partir de tranches de pomme de terre de 25 mm d'épaisseur. Cinquante µg de chacun des pigments dissouts dans du méthanol ont été appliqués sur des disques de papier Wathman. Ceux-ci sont déposés à la surface des disques de pomme de terre. De plus la même quantité de thaxtamine A dissoute dans du méthanol a aussi été déposée comme témoin positif. Une rondelle sur laquelle seulement du méthanol avait été appliqué servait de témoin négatif.

1.6-Caractérisation du clone 2.21

Le clone 2.21 se caractérisait par un effet de réduction importante de la croissance des plantules de radis. Il produisait aussi un pigment jaune qui avait un Rf se rapprochant de celui de la thaxtamine A et qui était toxique sur les tissus de pomme de terre. Il a donc été caractérisé plus en détails.

1.6.1-Étude du pouvoir pathogène du clone 2.21 sur des pommes de terre en croissance

Cette étude a comme principal but de vérifier si le clone 2.21 démontre une certaine agressivité contre les tubercules de pomme de terre. Le protocole employé pour cette étude est celui de Faucher et *al.* (1992) sauf que les plants de pomme de terre ont poussé dans un mélange de sable et de vermiculite (2 :1). Le pouvoir pathogène de 2.21 a été comparé à celui de *S. scabies* EF-35, de *S. lividans* TK-24 et *S. lividans* TK-24 pFD 666.

1.6.2-Purification d'un pigment jaune (pigment V) produit par le clone 2.21

Le clone 2.21 produisait un composé qui s'était montré toxique sur rondelle de pomme de terre. Ce produit a été purifié à partir de 20 litres d'une culture de milieu son d'avoine supplémenté de kanamycine. Suite à l'extraction du surnageant de culture à l'acétate d'éthyle et une chromatographie sur couche mince (voir section 1.5), la tache jaune dont le R_f se rapprochait de celui de la thaxtamine A a été éluée des plaques de silice et les produits la composant ont été séparés par HPLC. Pour ce faire, la tache jaune a été grattée de la silice, puis éluée dans un solvant composé à 70 % de méthanol et de 30 % de chloroforme. Le tout a été filtré sous vide avec un filtre MicronSep Cellulosic 0,45 μ et le mélange de solvants a été évaporé. Les résidus obtenus ont ensuite été dissous dans 25 % d'acétonitrile afin d'être purifiés au HPLC. L'appareil HPLC utilisé était un Varian LV5500 équipé avec une colonne Water's C18 (grosueur des particules 10- μ m, 3,9 mm X 125 mm). Les différents composés formant la tache jaune ont été séparés en utilisant un gradient d'acétonitrile de 25 % à 50 % pendant 20 minutes avec un débit de 1,3 ml/min et ils étaient détectés par UV en utilisant une longueur d'onde de 249 nm. La phase 1 récupérait un ensemble de composés de la première minute jusqu'à la quatrième. La phase

2 récoltait un composé ayant un temps de rétention très proche de celui de la thaxtamine A à partir de la sixième minute jusqu'à la neuvième. Finalement, la phase 3 récupérait de la neuvième jusqu'à la fin de l'élution. Aucun composé majeur n'était présent dans cette phase. Par la suite, l'acétonitrile a été évaporé sous l'évaporateur dans le but de récupérer ces composés. Le composé ayant un temps de rétention près de celui de la thaxtamine A a été nommé pigment V. La thaxtamine A a aussi été purifiée par la même procédure. Le pigment V et la thaxtamine A ont été réinjectés dans le HPLC. La quantité de produit utilisée pour faire ce dernier test était de 1,8 µg de pigment V et de 57 µg de thaxtamine A. Le temps de rétention et l'aire sous la courbe ont été notés et comparés pour chacune des analyses.

1.7-Comparaison du pigment V et de la thaxtamine A

1.7.1-Comparaison entre les spectres U.V. et visible du pigment V et de la thaxtamine A

Des spectres U.V. et visible ont été effectués dans le but de déterminer si le pigment V produit par le clone 2.21 pouvait avoir une similarité avec la thaxtamine A. Ces spectres ont été réalisés selon la méthode de King et Lawrence (1992). Le pigment V et la thaxtamine A ont été dissous dans l'éthanol absolu. La densité optique des deux produits ont été notée à partir de 215 nm jusqu'à 500 nm à tous les intervalles de 0,5 nm. Les spectres ont été effectués à la température de la pièce dans un spectrophotomètre Ultospec 2000 de Pharmacia Biotech.

1.7.2-Test de toxicité

La capacité de nécrose du pigment purifié a été testée sur les disques de pomme de terre (voir section 2.5.3). Six cent soixante ng de pigment V purifié à partir du HPLC ont été appliqués sur disque de pomme de terre et les effets de nécrose ont été comparés aux effets de la thaxtamine A.

1.8-Analyse de l'ADN du clone 2.21

Les ADNs totaux du clone 2.21, de *S. lividans* TK-24 et de *S. lividans* TK-24 transformé avec pFD666 ont été extraits, digérés et séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. La méthode employée pour extraire les ADNs totaux a été celle de Hopwood *et al.* (1985) avec les modifications qui suivent. Les ADNs totaux ont été extraits d'une culture de 50 ml de YME supplémentée de kanamycine et vieille de 30 heures. Les cultures ont subi une centrifugation de 10 minutes à 10000 rpm à 4 °C. Les culots ont été ressuspendus dans 6 ml de lysozyme à 2 mg/ml dans un tampon composé de 0,3 M de sucrose, de 25 mM de Tris-HCl à pH 8,0, de 25 mM d'EDTA à pH 8,0 et incubés pour 30 minutes à 37 °C. Les mycéliums étaient ensuite traités à la pronase. Six ml de pronase à 1 mg/ml dans le tampon de lyse (0,01 M de Tris-HCl à pH 7,8, 0,01 M d'EDTA à pH 8,0, 0,5 % de SDS) étaient ajoutés aux cellules et elles étaient incubées pour 60 minutes à 37 °C. Des extractions au phénol-chloroforme ont été effectuées jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair. Les surnageants obtenus ont été traités consécutivement avec les solutions I, II et III de Sambrook *et al.* (1989) et des extractions au phénol-chloroforme ont été répétées. Les ADNs étaient alors précipités et ressuspendus dans l'eau. Mille cinq cents ng de ces ADNs ont été digérés pendant 90 minutes à 37 °C avec les enzymes *Bam*HI, *Pvu*II et *Sal*I

dans un volume total de 100 µl. Après les digestions, tous les ADNs ont été précipités à l'éthanol et resuspendus dans 15 µl d'eau distillée. Ils ont ensuite été chargés sur un gel d'agarose à 1 % dans du tampon TAE. Les échantillons ont subi une électrophorèse de 30 volts pendant 20 heures dans un tampon TAE. Le gel a été coloré et photographié selon les méthodes employées à la section 2.4.1. Une fois le gel obtenu, un transfert des ADNs sur une membrane de nylon suivi d'une hybridation avec une sonde provenant d'un fragment de pFD666 ont été effectués. Les ADNs ont été transférés sur une membrane de Nylon par buvardage de type Southern. Le transfert s'est fait selon le protocole proposé par la compagnie Amersham Life Science et le buvardage a eu une durée de 20 heures.

La sonde qui a été utilisée dans cette hybridation était un fragment de 1,7 Kb provenant du vecteur pFD666. Ce fragment correspondait au site de clonage multiple ainsi qu'aux régions le bordant. Il a été obtenu à la suite d'une digestion par l'endonucléase *PvuII*. Vingt µg de pFD666 ont été digérés par 60 unités de *PvuII* dans un volume total de 300 µl. La digestion a eu une durée totale de 150 minutes à 37 °C. Par la suite, tout l'échantillon a été chargé dans un gel d'agarose à 0,8 % dans du tampon TAE. Les fragments d'ADN ont été séparés par une électrophorèse à 40 volts et ce pendant 4 heures. La bande correspondant au fragment de 1,7 Kb a été découpée du gel et a été purifiée grâce au kit Geneclean BIO 101 selon les instructions du manufacturier. Après la purification, l'ADN était précipité à l'éthanol (voir section 1.4.2) et sa concentration était estimée par la méthode sur pétri (voir section 1.4.1). Le fragment de 1,7 Kb de pFD666 était prêt pour le marquage. Le marquage a été fait avec la DIG et accompli selon la méthode de la DIG High Prime Labeling and Detection Starter Hit 1 de Boehringer Mannheim. Cinq cents ng du fragment de 1,7 Kb ont été utilisés comme sonde. L'hybridation entre les ADNs totaux fixés sur la membrane de nylon et la sonde a été effectuée selon la méthode de la DIG High Prime Labeling and Detection Starter Hit 1 de Boehringer Mannheim avec quelques précisions. D'abord, de l'ADN de sperme de saumon a été ajouté à la solution de pré-

hybridation et à la solution d'hybridation à une concentration de 2,5 mg / ml. La température de pré-hybridation et d'hybridation a été de 65 °C. La durée de la pré-hybridation a été de 2 heures 30 minutes et celle de l'hybridation de 16 heures. La détection a eu une durée de 3 heures.

CHAPITRE II

RÉSULTATS

2.1-Construction de la banque génomique de *S. scabies* EF-35

Une banque génomique de *S. scabies* EF-35 a été construite en utilisant le vecteur de clonage pFD666. L'enzyme *Bgl*III a été utilisée pour fragmenter le génome de *S. scabies* EF-35. Les fragments générés par la digestion avaient une longueur moyenne de 10 à 15 Kb. Suite à l'électroporation de la banque génomique à l'intérieur des cellules compétentes de *E. coli* DH10B, 1638 colonies au total ont été obtenues. Vingt-six colonies de ces 1638 ont été mises en culture et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits. De ces 26 ADNs plasmidiques, 18 possédaient un insert. À la figure 1, on peut observer que les ADNs plasmidiques extraits de *E. coli* DH10B et coupés avec l'enzyme *Hind*III, un enzyme présent dans le site de clonage multiple du plasmide, possédaient tous un insert. La longueur des plasmides extraits variait de 6,5 Kb à 23 Kb et était supérieure à la longueur du vecteur de clonage pFD666 (5,251 Kb). Ainsi, environ 70% des colonies obtenues suite à l'électroporation possédaient un insert. Selon Benigni *et al.* (1975), la probabilité d'avoir une banque génomique complète avec 1147 colonies recombinantes possédant un insert d'environ 10 à 15 Kb, était estimée à 85% (Figure 1).

Puits 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Figure 1. Patron de restriction des ADNs plasmidiques digérés par *Hind*III provenant de clones de la banque génomique de *S. scabies* EF-35 exprimée chez *E. coli* DH10B.

Puits 1 et 10) standard de poids moléculaire Lambda digéré par *Hind*III (21,130, 9,416, 6,557, 4,361, 2,322, 2,027 et 0,564 Kb) : puits de 2 à 9) différents clones de la banque génomique.

L'amplification de la banque génomique de *S. scabies* EF-35 exprimée chez *E. coli* DH10B a été faite, et les plasmides transformés chez *S. lividans* TK-24. Plusieurs protoplastes transformés ont été obtenus et un total de 1500 ont été repiqués sur milieu YME supplémenté de kanamycine. Le criblage pour le pouvoir pathogène sur des plantules de radis a été réalisé à partir de ces clones.

2.2-Criblage des clones de la banque génomique

2.2.1-Première sélection : étude du pouvoir pathogène des clones sur des plantules de radis poussées en prétri

Six cent sept clones exprimés chez *S. lividans* TK-24 ont subi la première sélection pour leur pouvoir pathogène sur les plantules de radis et 46 de ces clones semblaient avoir un effet sur la croissance des plantules de radis. Cet effet s'observait qualitativement par des plantules plus courtes, rabougries ou étiolées. Parfois, les feuilles de ces plantules avaient un début de chlorose. Les racines pouvaient avoir aussi de la nécrose. Ces 46 clones ont été retenus pour poursuivre les études de la deuxième et de la troisième sélection.

2.2.2-Deuxième sélection : étude du pouvoir pathogène sur les plantules de radis en tube

La deuxième sélection comportait en l'étude du pouvoir pathogène des plantules de radis en tube avec 10 répétitions par clone. Des 46 clones étudiés, 4 clones ont été retenus, parce que les plantules de radis poussant en leur présence étaient plus longues que celles en contact avec *S. lividans* TK-24. Les plantules poussant en présence de ces clones mesuraient entre 55,40 et 63,90 mm comparativement à celles poussant en présence de *S. lividans* TK-24 mesurant 46 mm. Ces 4 clones ont été nommés 10.1, 5.40, 5.37 et 13.4. À la suite du test d'égalité des espérances à des observations de variance égale, même si ces clones semblaient favoriser la croissance de ces plantules, la différence ne s'est pas révélée

significative à 95 %. Ces clones ne semblaient pas pathogènes puisque la longueur des radis associées à ces clones n'était pas significativement différente de celle associée aux radis poussés en présence de *S. lividans* TK-24 (Figure 2).

Trois clones ont été retenus pour avoir un effet d'inhibition sur la croissance des plantules de radis. Ces plantules de radis étaient plus courtes et rabougries. D'ailleurs, la longueur moyenne de ces plantules variait de 21,40 à 23,00 mm comparativement à celles poussant en présence de *S. scabies* EF-35 ayant une longueur moyenne de 19,00 mm. Ces clones ont été nommés 2.21, 15.5 et 15.38. Aucune différence significative n'a été observée entre la longueur des radis inoculés par ces clones et *S. scabies* EF-35. Par contre, une différence significative a été notée entre la longueur des radis ayant poussés en présence de ces clones et de *S. lividans* TK-24.

Deux clones ont été retenus parce que les plantules de radis poussant en leur présence avaient une longueur moyenne intermédiaire entre celles ayant été en contact avec *S. scabies* EF-35 et *S. lividans* TK-24. Ils ont été nommés 13.34 et 1.41. Aucune différence significative n'a été observée entre ces clones, *S. scabies* EF-35 et *S. lividans* TK-24.

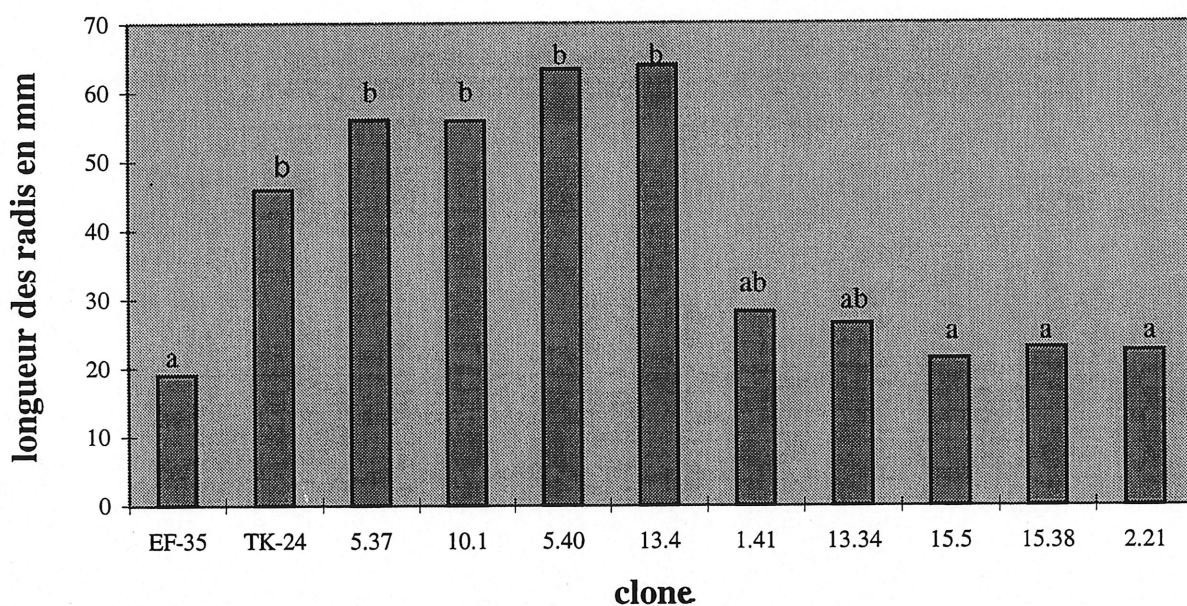


Figure 2. Longueur moyenne des plantules de radis ayant poussé en présence des différents clones, de *S. scabies* EF-35 et de *S. lividans* TK-24.

Les barres surmontées par une même lettre indiquent que les traitements qu'elles représentent ne sont pas statistiquement différents ($p < 0,05$).

2.2.3-Troisième sélection : étude de la production de pigments jaunes

L'étude a été menée en parallèle avec la deuxième sélection. Elle consistait en la vérification de la production de pigments jaunes dans le milieu à base de gruau par les

clones. Cette étude a été faite parce que la thaxtomine A, sécrétée par *S. scabies* EF-35, a une coloration jaune. Sur les 46 clones retenus après la première sélection, 4 clones ont produit des pigments jaunes, soit les clones 9.1, 9.8, 4.17 et 2.21 (Tableau 1). Trois d'entre-eux (4.17, 9.1 et 9.8) n'avaient pas d'effet d'inhibition sur les plantules de radis. Ainsi, aucune différence significative n'a été observée entre la longueur des radis inoculés avec ces trois clones et *S. lividans* TK-24. Par contre, une différence significative a été observée avec *S. scabies* EF-35. Le clone 2.21 était le seul à produire des pigments jaunes et à avoir un effet d'inhibition sur les plantules de radis (figure 2 et tableau 1).

Suite à la production de pigments jaunes dans le milieu de production à base de gruau, une TLC a été effectuée. Les Rf de chacun des pigments jaunes des clones 2.21, 9.1, 9.8 et 4.17 ont été comparés avec celui de la thaxtomine A, phytotoxine sécrétée par *S. scabies* EF-35 et celui de l'actinorhodine, pigment sécrété par la souche hétérologue *S. lividans* TK-24. Le pigment jaune no 1 du clone 2.21 avait un Rf près de celui de la thaxtomine A, soit de 0,35 par rapport à 0,34 respectivement (tableau 2).

2.3-Étude de la toxicité des pigments jaunes

Chacun des pigments jaunes des 4 clones (9.8, 9.1, 4.17 et 2.21) retenus après la troisième sélection a été appliqué sur des rondelles de pomme de terre pour évaluer leur toxicité sur les tissus végétaux. Un seul des pigments jaunes s'est avéré toxique, soit le pigment jaune no 1 du clone 2.21. Après 48 heures en contact avec la rondelle de pomme de terre, une nécrose a pu être observée. La nécrose était présente sur toute la circonférence de la rondelle. Elle était moins sévère mais toutefois comparable à la nécrose causée par la thaxtomine A. Les rondelles de pomme de terre ayant été mises en contact avec les

Tableau 1. Caractéristiques des différents clones retenus

| Clone ou souche | Longueur des plantules de radis inoculés (mm) ¹ | Nombre de pigments observés sur TLC ² |
|--------------------|---|---|
| 13.4 | 63,90 ^b | - ³ |
| 5.40 | 63,40 ^b | - |
| 10.1 | 56,00 ^b | - |
| 5.37 | 55,40 ^b | - |
| TK-24 | 46,00 ^b | - |
| 9.8 | 43,17 ^b | 2 |
| 4.17 | 42,60 ^b | 5 |
| 9.1 | 34,80 ^b | 5 |
| 1.41 | 28,20 ^{ab} | - |
| 13,34 | 26,50 ^{ab} | - |
| 15.38 | 23,00 ^a | - |
| 2.21 | 22,50 ^a | 3 |
| 15.5 | 21,40 ^a | - |
| EF-35 | 19,00 ^a | 11 |

Les nombres accompagnés d'une même lettre ne sont pas significativement différents (p<0,05%)

1 : moyenne des 10 répétitions

2 : les pigments ont été extraits d'un surnageant de culture de son d'avoine et appliqués sur TLC

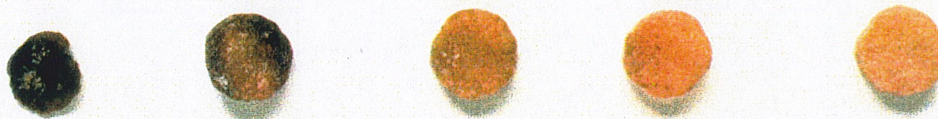
3 : aucun pigment n'a été observé

Tableau 2. Migration des pigment jaunes des clones 2.21, 9.8, 9.1, 4.17, de la thaxtomine A et de l'actinorhodine sur TLC.

| Clone | Pigments | Rf |
|-------|---------------|------|
| | thaxtomine A | 0,34 |
| 2.21 | pigment 1 | 0,35 |
| 2.21 | pigment 2 | 0,52 |
| 2.21 | pigment 3 | 0,62 |
| 9.8 | pigment 1 | 0,53 |
| 9.8 | pigment 2 | 0,64 |
| 9.1 | pigment 1 | 0,34 |
| 9.1 | pigment 2 | 0,35 |
| 9.1 | pigment 3 | 0,47 |
| 9.1 | pigment 4 | 0,62 |
| 9.1 | pigment 5 | 0,70 |
| 4.17 | pigment 1 | 0,27 |
| 4.17 | pigment 2 | 0,32 |
| 4.17 | pigment 3 | 0,44 |
| 4.17 | pigment 4 | 0,59 |
| 4.17 | pigment 5 | 0,66 |
| | actinorhodine | 0,22 |

Solvant de migration : chloroforme : méthanol (90 : 10)

pigments jaunes 2 et 3 produits par le clone 2.21, de même que la rondelle ayant été mise en contact avec le méthanol sont demeurées saines (Figure 3).



Thaxtomine A pigment no 1 pigment no 2 pigment no 3 méthanol

Figure 3. Étude de la toxicité des pigments jaunes produits par le clone 2.21 sur rondelle de pomme de terre.

2.4-Étude du clone 2.21

Le clone 2.21 a été caractérisé plus en détail premier, car il semblait avoir un effet d'inhibition sur la croissance des plantules de radis et produisait des pigments jaunes dans le milieu à base de gruau. De plus, l'un des pigments jaunes, le pigment jaune no 1, pouvait induire une nécrose sur les tissus de pomme de terre. *S. scabies* EF-35, une souche pathogène pour les plantules de radis, agit en inhibant leur croissance en produisant de la thaxtomine A. La vérification des propriétés du clone 2.21 et la caractérisation du pigment jaune no 1 par rapport à *S. scabies* EF-35 et la thaxtomine A ont été effectuées.

2.4.1-Purification du produit nécrosant sécrété par le clone 2.21

Vingt litres de culture du clone 2.21 ont été produits dans le milieu de culture à base de gruau supplémenté de kanamycine. Le pigment jaune no 1 ayant un Rf semblable à la thaxtomine A a été gratté des plaques de silice et élué de celles-ci pour ensuite être purifié par HPLC. Au total 4,2 mg de composés formant la tache jaune ont été élués de la silice. Lors de la purification par HPLC, un ensemble de pics très rapprochés les uns des autres étaient observables dès la première minute et jusqu'à la quatrième minute de temps de rétention. Cet ensemble de pics semblait constituer les composés majeurs de la tache jaune. Ces composés ont été récoltés en récupérant la phase se situant entre 1 minute et 5 minutes de temps de rétention. Un deuxième pic était visible à 8,49 minutes de temps de rétention. Même si ce pic était mineur, il a été récupéré parce qu'il sortait à un temps de rétention très près de celui de la thaxtomine A. La phase récoltée se situait entre 6 et 9 minutes de temps de rétention. Aucun pic d'intensité notable sortait après 9 minutes de temps de rétention, mais la phase représentant la neuvième minute jusqu'à la fin de l'élution a tout de même été récupérée. Le solvant de chacune des trois phases récoltées a été évaporé sous un Speed Vac Concentrator. La quantité finale purifiée pour les pics majeurs situés entre 1 à 4 minutes de temps de rétention était de 2 mg et de 8 ug pour le pic mineur sortant à 8,49 minutes. Ce composé du pic mineur a été nommé le pigment V. Finalement, 1,1 mg de composés ont été récupérés pour la dernière phase (figure 4).

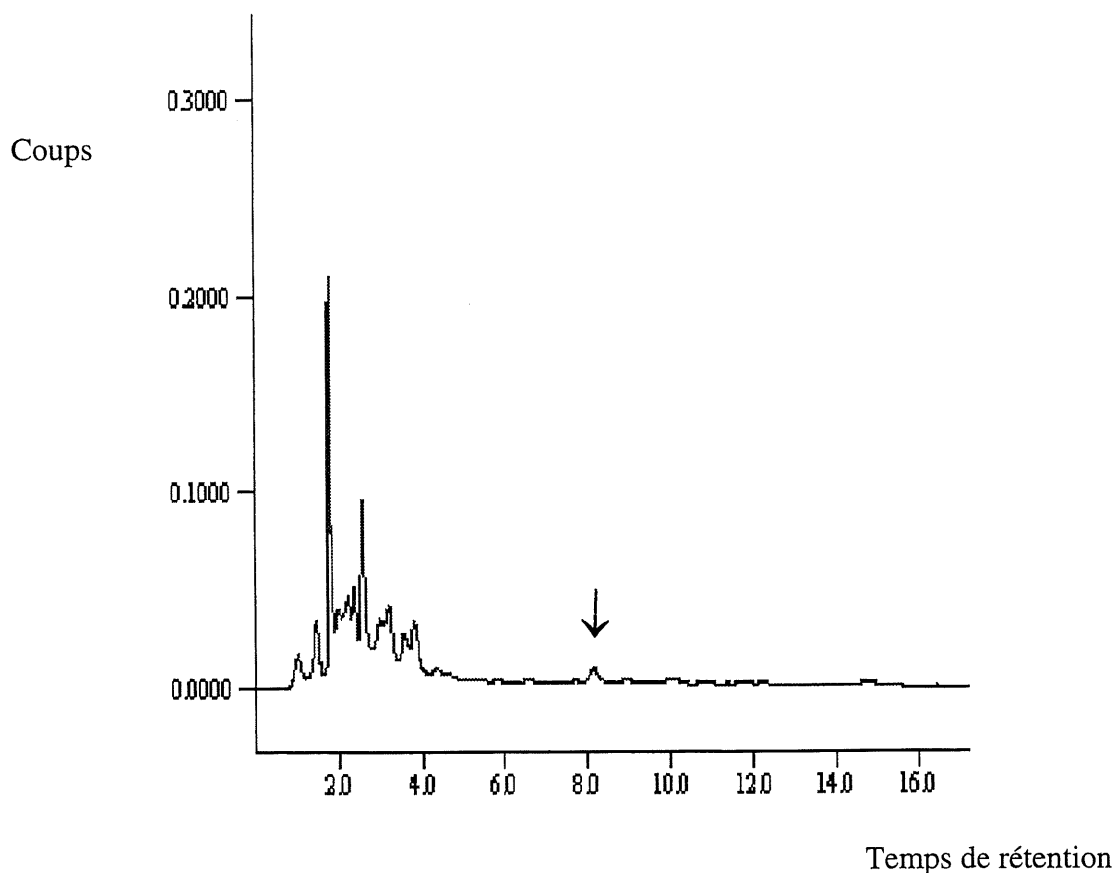


Figure 4. Représentation graphique de la séparation des produits composant la tache jaune ayant des propriétés nécrosantes du clone 2.21.

La flèche indique le pic représentant le pigment V.

2.4.2-Étude de la toxicité sur rondelle de pomme de terre des trois phases récupérées par HPLC

Les produits des phases I, II et III ont par la suite été testés pour leur pouvoir nécrosant sur rondelle de pomme de terre. Le pigment V, composant principal de la phase II, s'est avéré toxique sur les tissus de pomme de terre. Une nécrose a été observée sur la circonférence de la rondelle de pomme de terre après 48 heures. Cette nécrose était comparable à celle causée par la thaxtomine A, mais avec moins de sévérité. Les rondelles de pomme de terre

ayant été mises en contact avec les composants de la phase I et III et avec le méthanol sont demeurées saines (figure 5).



Thaxtamine A pigment V phase 1 phase 3 méthanol

Figure 5. Étude de la toxicité des phases I, II et III purifiées par HPLC du clone 2.21 sur rondelle de pomme de terre.

2.4.3-Étude comparative du pigment V et de la thaxtamine A

2.4.3.1-Comparaison de la thaxtamine A et du pigment V sécrété par le clone 2.21 par HPLC

Une étude comparative entre la thaxtamine A et le pigment V a été effectuée au HPLC pour comparer les temps de rétention des deux produits. Les résultats obtenus sont un temps de rétention de 8,36 min pour la thaxtamine A et un temps de rétention de 8,49 min pour le pigment V du clone 2.21. Les aires sous la courbe sont de 400326 (57 ug) et 13032 coups (1,86 ug) pour la thaxtamine A et le pigment V respectivement.

Lorsque les courbes de détection de la thaxtamine A et du pigment V du clone 2.21 sont superposées, on observe en premier lieu que la thaxtamine A est présente en plus grande quantité que le pigment V. En second lieu, on remarque que les pics de détection des deux échantillons sont très près l'un de l'autre, mais avec un léger retard pour le pigment V. Il est aussi notable que les deux échantillons ont bien été purifiés, car aucun autre pic n'est présent sur la courbe (figure 6).

Coups

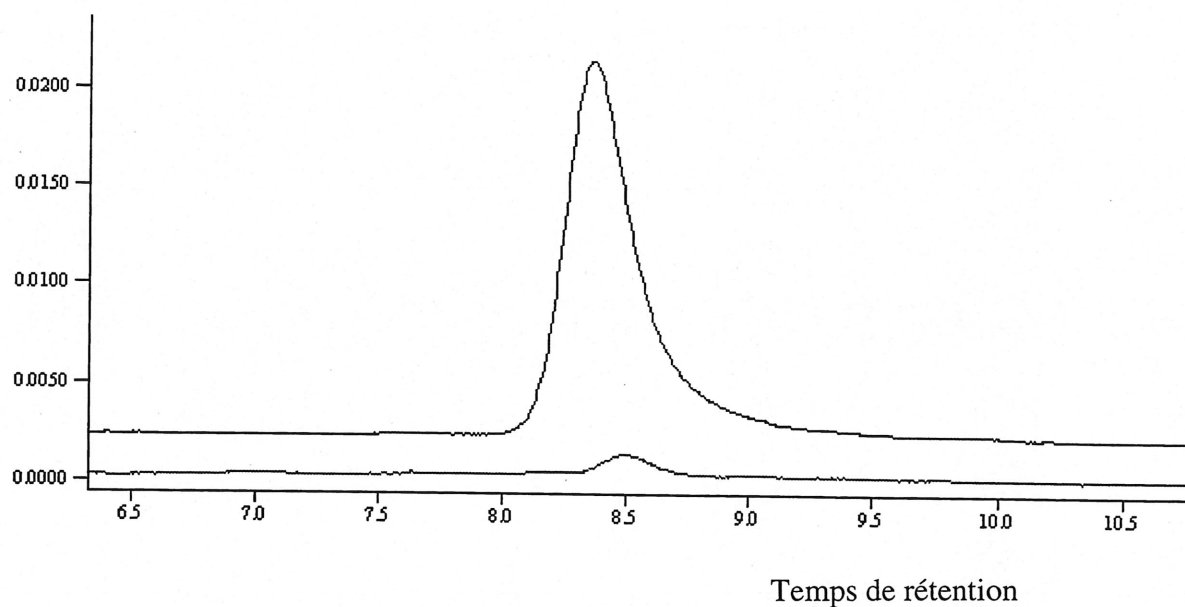


Figure 6. Détection de la thaxtamine A et du pigment V du clone 2.21 par HPLC.

2.4.3.2-Spectres U.V. et visible

Des spectres U.V. et visible de la thaxtamine A purifiée par HPLC et du pigment V produit par le clone 2.21 ont été effectués afin de comparer les deux produits. La comparaison des spectres de chacun des échantillons démontre que ceux-ci sont très semblables. L'analyse de ces spectres a montré trois pics majeurs. D'abord, l'absorbance maximale pour la thaxtamine A et pour le pigment V a été observée à une longueur d'onde de 215 nm. Par la suite, l'absorbance des deux spectres a subi une descente abrupte et un second pic a été noté entre 230 et 233 nm. Après ce second pic, l'absorbance des spectres a continué à diminuer. Finalement, les deux spectres avaient un troisième pic similaire à 386,5 nm. (figures 7 et 8).

2.5-Étude du pouvoir pathogène du clone 2.21 sur les tubercules de pomme de terre

Suite à l'étude du pouvoir pathogène sur les plants de pomme de terre, les tubercules fils des plants ayant poussé en présence de *S. scabies* EF-35, de *S. lividans* TK-24 et du clone 2.21 ont été récoltés et observés. Quarante-quatre pour cent des tubercules fils ayant poussé en présence de *S. scabies* EF-35 ont été atteints par la gale commune. Tous les tubercules fils provenant des plants ayant été mis en contact avec *S. lividans* TK-24 sont demeurés sains. Un test du χ^2 a été effectué pour déterminer les différences significatives. Ce test a démontré qu'il y avait une différence significative entre le nombre de tubercules fils atteints des plants poussant en présence de *S. scabies* EF-35 et de

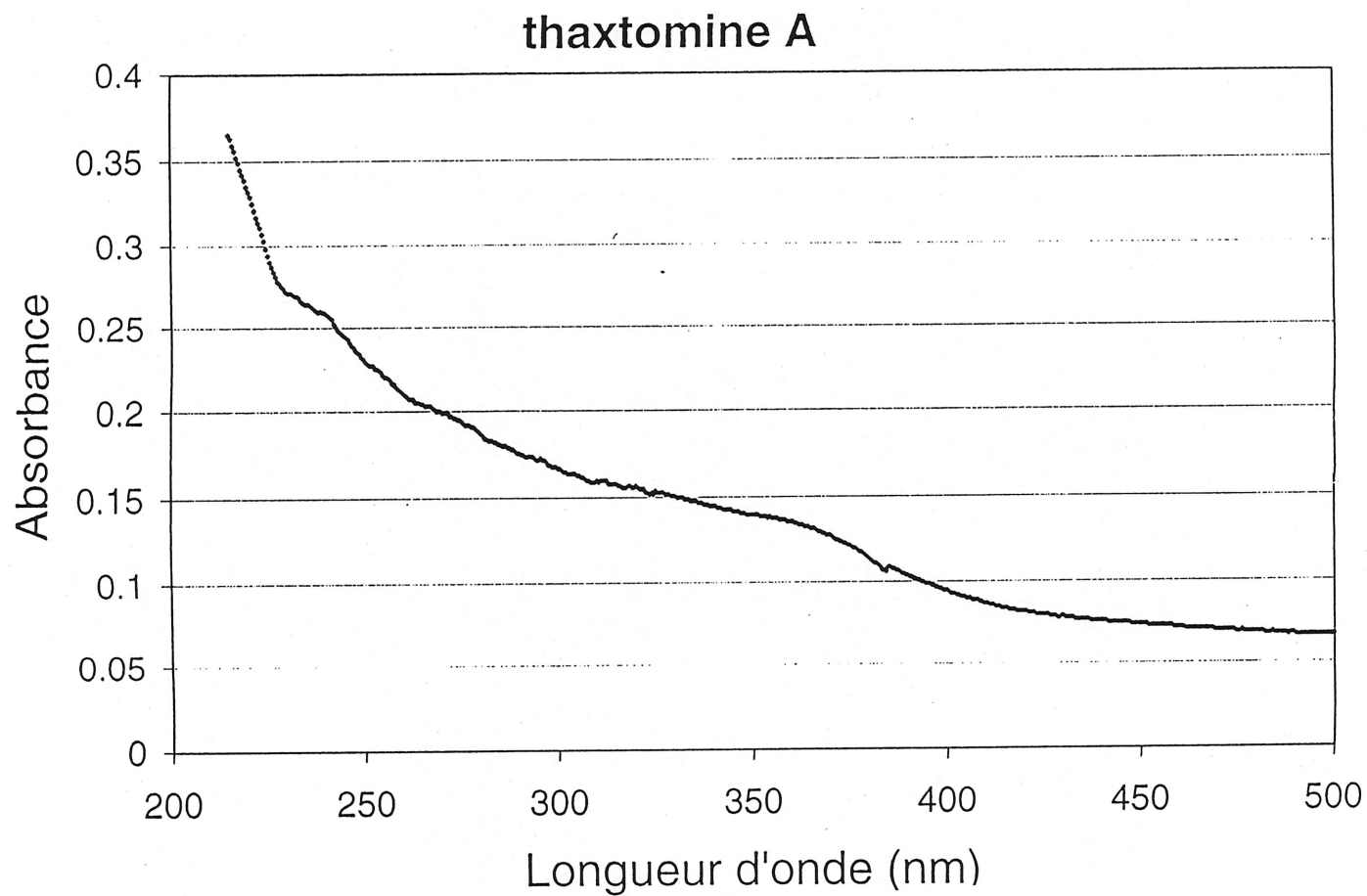


Figure 7. Spectres U.V. et visible de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde de la thaxtamine A.

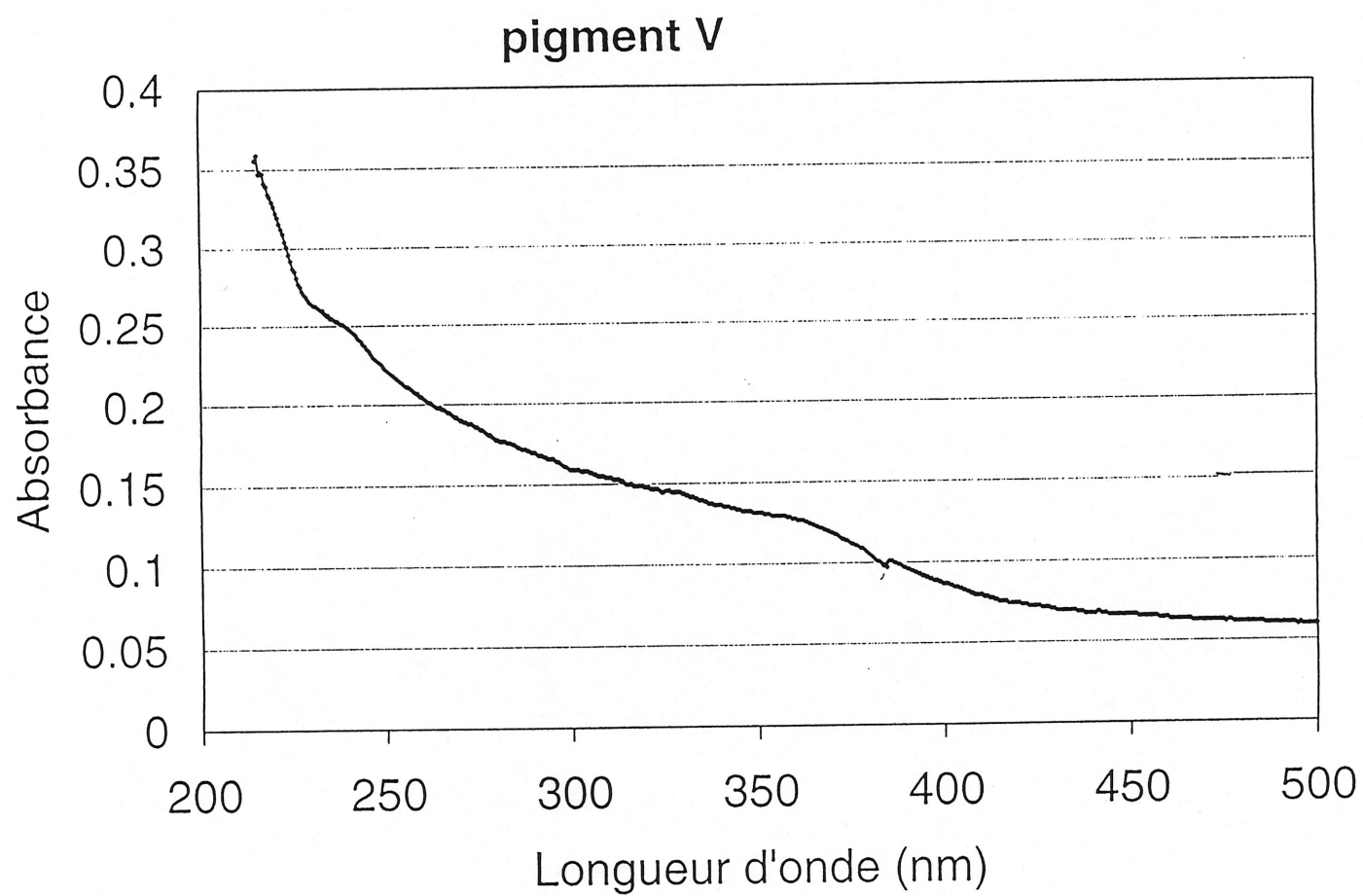


Figure 8. Spectres U.V. et visible de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde du pigment V du clone 2.21.

S. lividans TK-24. La maladie a été observée sur 15,4 % des tubercules fils des plants poussant en présence du clone 2.21. Les symptômes portés par ces tubercules étaient comparables à la gale superficielle causée par *S. scabies* EF-35, mais le taux de couverture des symptômes sur les tubercules était inférieur. Une différence significative a été observée entre le nombre de tubercules fils atteints des plants poussant en présence du clone 2.21 et de *S. scabies* EF-35 tandis qu'aucune différence significative n'a été notée entre les tubercules fils atteints des plants poussant avec *S. lividans* TK-24 (figure 9).

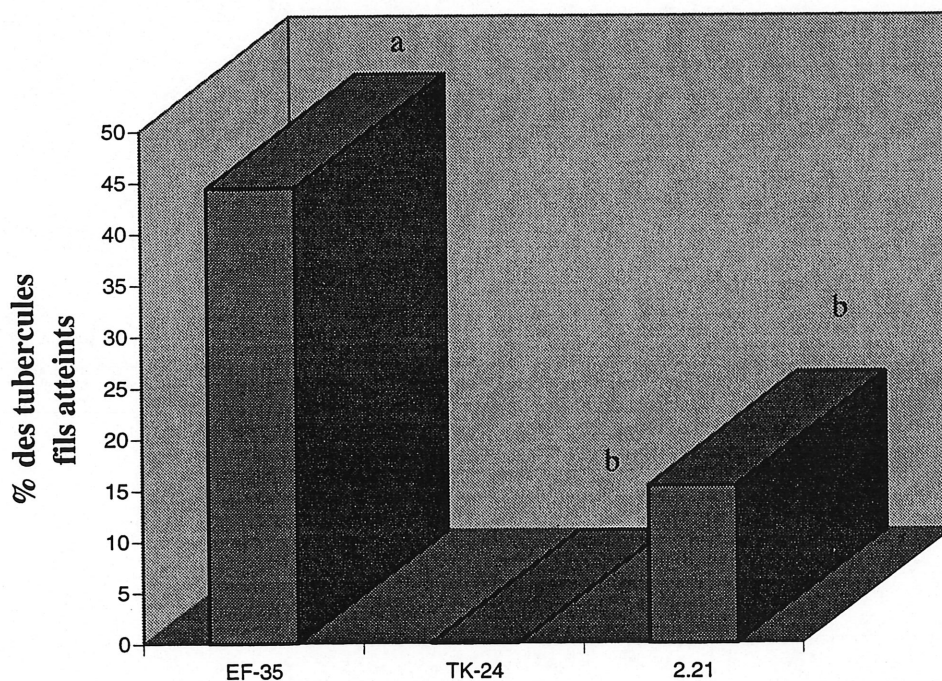


Figure 9. Pouvoir pathogène du clone 2.21, de *S. scabies* EF-35 et de *S. lividans* TK-24 sur les tubercules de pomme de terre.

Les barres accompagnées d'une même lettre représentent des données qui ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05\%$).

2.6-Analyse de l'ADN du clone 2.21

L'ADN total du clone 2.21 a été extrait et digéré avec des enzymes de restriction ayant des sites présents dans le plasmide pFD666. Le plasmide extrait non-digéré du clone 2.21 avait une longueur similaire au vecteur pFD666 intact. L'analyse des fragments obtenus suite aux digestions de l'ADN plasmidique du clone 2.21 démontre que la taille des fragments obtenus correspondaient à celle du vecteur intact digéré avec ces mêmes enzymes (figure 10).

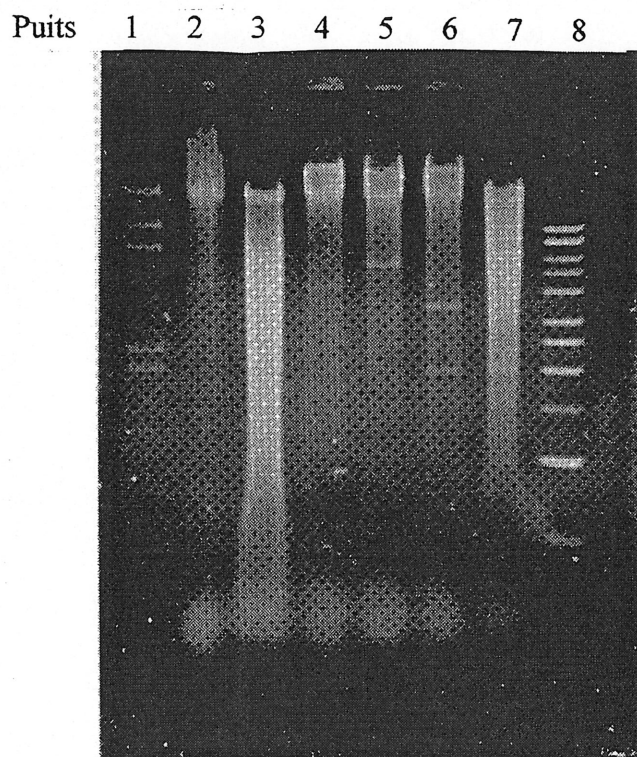


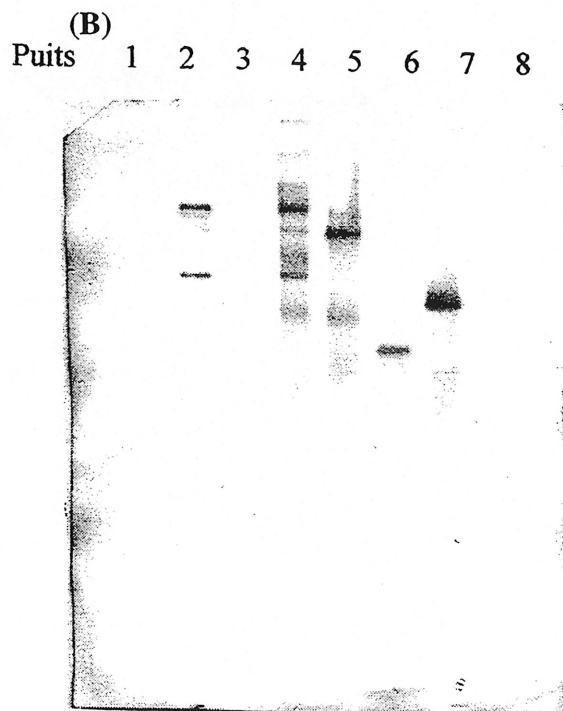
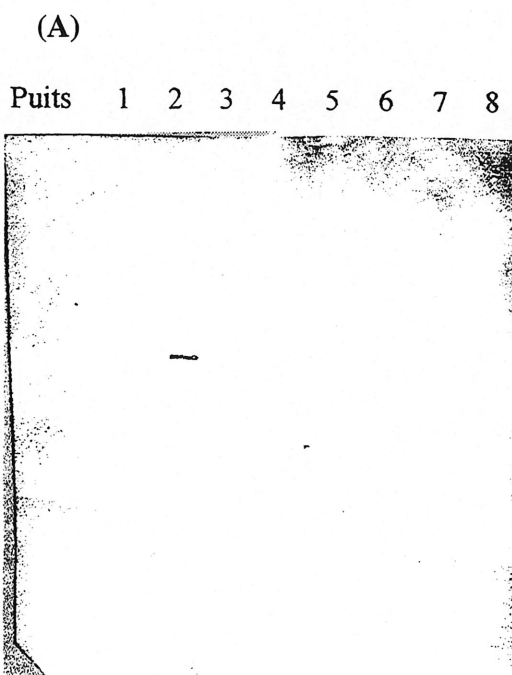
Figure 10. Patron de restriction de l'ADN total du clone 2.21 digéré par les enzymes *Sall*, *SacI*, *HindIII*, *XbaI-DraI* et *BamHI*.

Puits 1 et 8) standard de poids moléculaire Lambda digéré par *HindIII* (21,130, 9,416, 6,557, 4,361, 2,322, 2,027 et 0,564 Kb), puit 2 à 7) ADN du clone 2.21 non-digéré, digéré par *Sall*, *SacI*, *HindIII*, *XbaI-DraI* et *BamHI* respectivement.

Comme le clone 2.21 avait des propriétés différentes de celles de la souche d'expression *S. lividans* TK-24, et qu'il semblait posséder un vecteur intact, une étude de l'ADN total du clone 2.21 a été faite. Une hybridation a été effectuée sur l'ADN total du clone 2.21 avec une sonde de 1,7 Kb provenant du vecteur pFD666. Cette sonde était issue d'un fragment du vecteur pFD666 digéré avec l'enzyme *PvuII* comprenant le site de clonage multiple ainsi que les deux régions le bordant. Ainsi, si une insertion au niveau chromosomique du vecteur comportant un insert chez le clone 2.21 avait eu lieu, d'autres signaux seraient visibles en plus des signaux s'hybridant au vecteur intact après révélation de la membrane. Dans le cas contraire, seules les bandes du vecteur intact devraient être observables sur la membrane. D'abord, pour s'assurer que la sonde était bien spécifique, une hybridation a été effectuée entre la sonde et l'ADN total de *S. lividans* TK-24. En théorie, aucune hybridation ne devrait avoir lieu entre l'ADN total de *S. lividans* TK-24 et la sonde. *S. lividans* TK-24 transformé avec le vecteur pFD666 a aussi été hybridé avec la sonde et était utilisé comme témoin positif. Son ADN total a été digéré avec les enzymes *BamHI*, *PvuII* et *Sal I*. Théoriquement, une bande de 5,3 Kb représentant la longueur totale du plasmide pFD666 devait être reconnue lorsque la sonde est hybridée à l'ADN de *S. lividans* TK-24 pFD666 digéré par l'enzyme *BamHI*, car ce site était présent qu'une seule fois dans le plasmide. Une bande à 1,6 Kb devrait aussi être reconnue par la sonde suite à la digestion avec l'enzyme *PvuII*. Pour la digestion avec *SalI*, le fragment devant s'hybrider avec la sonde devrait avoir une longueur de 2,5 Kb. Une fois les hybridations réalisées entre les ADNs totaux de *S. lividans* TK-24, de *S. lividans* TK-24 transformé avec le vecteur pFD666 et du clone 2.21 avec la sonde, les résultats suivants ont été obtenus. Comme prévu, aucune hybridation n'a eu lieu entre l'ADN total de *S. lividans* TK-24 et la sonde (figure 11 A). Sur la membrane portant l'ADN total de *S. lividans* TK-24 pFD666, toutes les bandes qui devaient s'hybrider avec la sonde ont été observées et ces bandes avaient la taille attendue. Dans le puits de la digestion avec l'enzyme *BamHI*, deux autres bandes ont été révélées à 5,6 Kb et 2,5 Kb (figure 11 B, puits 5). Elles étaient de plus faible intensité. Ces deux bandes pourraient être du plasmide non-digéré, car elles sont aussi

présentes dans le puits portant l'ADN non-digéré (figure 11 B, puits 4). Dans le puits de l'ADN digéré par l'enzyme *SalI*, une deuxième bande de très faible intensité était aussi observable à 700 pb (figure 11 B, puits 7).

Enfin, sur la membrane portant l'ADN total du clone 2.21, nous avons eu le même patron d'hybridation que celui de *S. lividans* TK-24 pFD666 sauf que de nouvelles bandes ont été également obtenues. Ainsi, pour la digestion par l'enzyme *BamHI*, une bande de 2,5 Kb et une autre de 1,7 Kb ont été révélées (figure 11C, puits 5). Dans le puits portant l'ADN digéré par l'enzyme *PvuII*, 2 autres bandes étaient observables à 3,6 Kb et à 2,3 Kb (figure 11C, puits 6). Celle de 3,6 Kb était de plus faible intensité. Pour la digestion par l'enzyme *SalI*, 5 nouvelles bandes ont été révélées sur la membrane. Ces 5 bandes avaient tout une intensité comparable. La longueur de chacune de ces bandes était de 4,5 Kb, de 4,3 Kb, de 3,8 Kb, de 3,5 Kb et de 1,9 Kb (figure 11 C, puits 7).



(C)

Puits 1 2 3 4 5 6 7 8

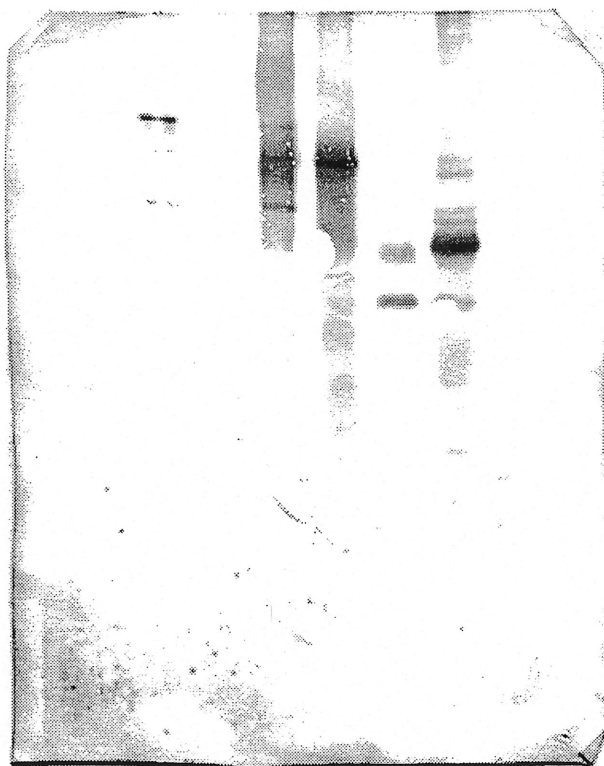


Figure 11. Hybridation entre la sonde de 1,7 Kb provenant du vecteur pFD666 et l'ADN total de *S. lividans* TK-24 (A), *S. lividans* pFD666 (B) et du clone 2.21 (C). Puits 1) standard de poids moléculaire 1 Kb, puits 2) vecteur pFD666 non-digéré, puits 4) ADN total non digéré, puit 5 à 7) ADN total digéré avec *Bam*HI, *Pvu*II et *Sal*I respectivement.

CHAPITRE III

DISCUSSION

Streptomyces scabies a été le premier organisme identifié comme responsable la gale commune chez la pomme de terre. Les mécanismes de virulence pouvant lui conférer son pouvoir pathogène sont jusqu'à ce jour encore mal compris. Il est connu que la thaxtomine A, phytotoxine sécrétée par *S. scabies*, est un facteur essentiel au pouvoir pathogène de la bactérie (Goyer *et al.* 1998). Les gènes responsables des mécanismes de virulence sont peu connus. Le gène *necI*, cloné par Bukhalid *et al* en 1997, dirige la production d'un composé capable de causer une nécrose sur les tissus de pomme de terre. Ce composé a des caractéristiques physico-chimiques différentes de la thaxtomine A. Les gènes de biosynthèse de la thaxtomine A n'ont toujours pas été clonés. Le but principal de cette maîtrise de recherche était d'identifier de nouvelles régions génétiques impliquées dans le pouvoir pathogène de *S. scabies*. Trois objectifs avaient été fixés pour nous permettre d'atteindre ce but : premièrement, la construction d'une banque génomique de *S. scabies* EF-35, deuxièmement, la transformation des clones de la banque génomique dans un hôte hétérologue, *S. lividans* TK-24, et finalement, l'analyse du pouvoir pathogène des colonies recombinantes sur les plantules de radis et la caractérisation partielle des clones affectant la croissance des radis.

La construction d'une banque génomique de *S. scabies* EF-35 et le criblage de cette banque pour l'identification de clones impliqués dans le pouvoir pathogène, aura permis d'identifier 12 clones. Le criblage des colonies recombinantes s'est fait sur des plantules de radis, car il est connu que *S. scabies* est aussi capable d'inhiber la croissance de jeunes

plantules de dicotylédones (Leiner *et al.* 1996), en plus de causer la gale (Loria *et al.* 1997). De plus, l'utilisation de plantules de radis s'avérait un moyen simple et rapide pour le criblage. Les études de pouvoir pathogène sur les radis prenaient 6 jours et peu d'espace même avec les répétitions nécessaires comparativement à des tests de pouvoir pathogène sur plants de pomme de terre qui nécessitent 4 mois de croissance et beaucoup d'espace.

Les 12 clones ont été divisés en 4 groupes selon leur pouvoir pathogène sur radis. Le premier groupe était composé de 4 clones (13.4, 5.40, 10.1 et 5.37) qui semblaient favoriser la croissance des plantules de radis. À chaque fois que les plantules de radis étaient inoculées par ces clones, la longueur moyenne de ces plantules étaient supérieure à la longueur moyenne des plantules inoculées par *S. lividans* TK-24. Cependant, aucune différence significative n'était observée entre la longueur moyenne des plantules inoculées par les 4 clones et *S. lividans* TK-24. Toutefois, nous pensons qu'en augmentant le nombre de répétitions, il serait peut-être possible d'atteindre un niveau où la différence se révélerait significative. Hooker en 1981 avait rapporté que *S. scabies* produisait une phytohormone, l'acide 3-indole acétique (auxine). Cette phytohormone stimule la division cellulaire des tissus touchés par les lésions (Lapwood *et al.* 1973) et pourrait expliquer une augmentation de la croissance du radis. Nous avons conservé ces clones pour les caractériser ultérieurement au niveau moléculaire et pour vérifier s'ils sont porteurs des gènes codant pour la synthèse de l'acide 3-indole acétique. Jusqu'à maintenant, encore personne n'a cloné ces gènes chez *S. scabies* ou chez d'autres actinomycètes.

Les clones 1.41 et 13.34 formaient le deuxième groupe de clone retenus. Lorsque ces clones étaient inoculés sur les plantules de radis, ils semblaient diminuer leur croissance comparativement à celles poussant en présence de *S. lividans* TK-24. Néanmoins, aucune différence significative n'était observable entre ces 2 clones, *S. lividans* TK-24 et *S. scabies*

EF-35. Ainsi, ces 2 clones ne pouvaient être considérés pathogènes pour les plantules de radis, même si qualitativement la différence de longueur entre les plantules inoculées par les clones et celles inoculées avec *S. lividans* TK-24 était notable. Encore une fois nous pensons qu'en augmentant le nombre de répétitions, il serait possible d'atteindre un niveau où la différence deviendrait significative. Cela reste à confirmer. Ces clones pourraient donc contenir un fragment d'ADN de *S. scabies* EF-35 codant pour un facteur de virulence.

Le troisième groupe de clones a été sélectionné parce qu'ils produisaient des pigments jaunes dans le milieu à base de gruau. *S. scabies* synthétise *in vitro* les thaxtomines, phytotoxines jaunes, seulement dans des milieux de culture à base végétale comme le son d'avoine (Beauséjour *et al.* 1999). Quatre clones composaient ce groupe, 9.8, 9.1, 4.17 et 2.21. Trois d'entre eux n'avaient aucun effet sur la croissance des plantules de radis. Il semblerait donc que ces trois clones (9.1, 9.8 et 4.17) portaient un fragment d'ADN codant pour des pigments n'ayant aucun rôle dans le pouvoir pathogène de la bactérie. Le clone 2.21 était le seul du groupe à avoir un effet d'inhibition sur la croissance des plantules de radis.

Le dernier groupe de clones conservés était au nombre de 3, les clones 15.38, 15.5 et 2.21 le composaient. Tous ces clones inhibaient la croissance des plantules de radis et la longueur des plantules inoculées par ces clones était considérée significativement différente de celles des plantules inoculées par *S. lividans* TK-24. Ils devraient donc porter un fragment d'ADN provenant de *S. scabies* EF-35 pouvant leur conférer un pouvoir d'inhibition de croissance des plantules en germination.

Le clone 2.21 était le seul des 12 clones conservés qui pouvait inhiber la croissance des plantules de radis et pouvait produire des pigments jaunes dans le milieu son d'avoine. Lawrence *et al.* (1990) démontraient qu'en appliquant les thaxtomines, des composés jaunes, directement sur les tubercules stériles, les symptômes de la gale étaient reproductibles. Ainsi, suite à l'étude de toxicité de tous les pigments jaunes de chacun des clones, le test a démontré que le pigment jaune numéro 1 sécrété par le clone 2.21, était le seul de tous les pigments pouvant induire une nécrose sur la rondelle de pomme de terre. Ce résultat pourrait expliquer que le clone 2.21 était le seul des 4 clones à produire des pigments jaunes, qui inhibait la croissance des plantules de radis. L'effet toxique du pigment no 1 était visible après 48 heures et la sévérité de la nécrose augmentait avec le temps. Cet effet toxique était comparable à celui causé par la thaxtominine A. Quoique la thaxtominine A fut appliqué en même quantité, l'effet causé par cette toxine était beaucoup plus sévère. Ceci peut être expliqué par le fait que le pigment numéro 1 est formé de plusieurs composés (voir figure 4), dont seulement un possède le pouvoir nécrosant, le pigment V. Ce pigment V représentait 0,26% de la quantité totale du pigment jaune numéro 1. La quantité de produit toxique appliqué était donc de 0,13 µg pour le pigment V comparativement à 50 µg pour la thaxtominine A. Il a été démontré que le degré de virulence de la bactérie pathogène est proportionnelle avec la quantité de thaxtominine A produite (Loria *et al.* 1995). Il est probable que l'effet toxique du pigment V suit cette même relation.

Comme le pigment jaune numéro 1 du clone 2.21 avait des propriétés communes à la thaxtominine A, soit la couleur jaune, l'insolubilité dans l'eau, la toxicité sur les tissus végétaux et son Rf sur TLC, des études comparative par HPLC et par spectres U.V. et visible ont été faites. D'abord le Rf de la thaxtominine A était de 0,34 et celui du pigment jaune numéro 1 de 0,35. Cette petite différence n'exclut pas la possibilité que le pigment numéro 1 contienne de la thaxtominine A. En effet, cette différence peut être interprétée par une addition ou un retrait d'un groupement chimique sur la molécule changeant sa polarité

et affectant sa migration. Mais surtout, cette différence peut être attribuable au fait que le pigment jaune numéro 1 était constitué de plusieurs composés, dont le pigment V, ayant des structures chimiques différentes. De plus, 2.21 produisait 3 pigments jaunes (I, II, et III) et il fallait saturer la plaque de silice pour s'assurer de voir le pigment jaune numéro 1. Il est possible que cette saturation nuise à la migration. Le Rf de la thaxtomine A retrouvé dans la littérature est de 0,27 (King *et al.* 1992). Il est différent de celui que nous avons obtenu, mais il est connu que les Rf peuvent varier selon l'activité de l'adsorbant et la saturation de la cuve (Beaudoin *et al.* 1991). À cause de toutes les propriétés communes entre le pigment jaune numéro 1 et la thaxtomine A, une purification de ce pigment a été entreprise. La purification au HPLC a démontré que les composés majeurs de ce pigment ne correspondaient pas à la thaxtomine A, puisque ces derniers avaient des temps de rétention de 1 à 4 minutes. Cependant, la purification nous a montré qu'un des composés mineurs avait un temps de rétention avoisinant celui de la thaxtomine A. C'est ce composé que nous avons appelé pigment V. La deuxième étude de toxicité sur les rondelles de pomme de terre a démontré que c'était le pigment V qui conférait le pouvoir nécrosant au pigment jaune numéro 1.

Un autre indice que le pigment V est important, mais qu'il est produit en petite quantité est l'étude du pouvoir pathogène sur les plants de pomme de terre. Le clone 2.21 a montré qu'il pouvait induire de petites lésions superficielles sur les tubercules fils des plants de pomme de terre ayant poussé en sa présence. Ces lésions sont semblables aux lésions superficielles causées par *S. scabies* EF-35. Cependant, le clone 2.21 cause des lésions sur seulement 16 % des tubercules fils ce qui a été considéré significativement différent de *S. scabies* EF-35 qui cause la gale commune sur 44 % des tubercules fils. La faible quantité de pigment V produite par le clone 2.21 est l'une des raisons pouvant expliquer ce résultat. Une baisse dans la production de la thaxtomine A coïncide avec une réduction dans l'agressivité au niveau de la virulence sur les tubercules fils (Goyer *et al.* 1998).

Les études comparative faites par HPLC et par spectres d'absorption U.V. et visible entre le pigment V et la thaxtamine A ont confirmé que le pigment V avait une composition chimique fortement apparentée à la thaxtamine A. La thaxtamine A que nous avons purifiée par HPLC avait un temps de rétention de 8,36 minutes alors que le pigment V avait un léger retard de 0,13 minutes sur le temps de rétention de la thaxtamine A. Cette petite différence n'élimine pas le fait que le pigment V puisse être de la thaxtamine A, car il arrive qu'il y ait des petites différences de temps de rétention pour un même produit d'un chromatogramme à l'autre.

Les longueurs d'onde à laquelle les maximums d'absorption des spectres U.V. et visible ont été obtenus pour la thaxtamine A et le pigment V étaient identiques (215, 233 et 386,5 nm). En comparant avec King *et al.* (1992), les longueurs d'ondes maximales de la thaxtamine A étaient de 398 nm, 343 nm, 279 nm, 249 nm et de 220 nm. Les résultats que nous avons obtenus sont un peu différents de King *et al.* (1992). Ces différences peuvent être expliquées par le fait que le spectrophotomètre que nous avons utilisé était différent et par l'usure des lampes. La faible quantité de pigment V produit ne nous a malheureusement pas permis de confirmer que le pigment V avait une structure chimique semblable à la thaxtamine A. Pour confirmer hors de tout doute, une analyse RMN du pigment V et de la thaxtamine A devra être réalisée.

L'analyse de l'ADN total et les études d'hybridations ont démontré que le clone 2.21 avait un plasmide pFD666 intact et probablement un autre plasmide contenant le fragment d'ADN de *S. scabies* EF-35, intégré au niveau chromosomique de *S. lividans* TK-24 lui donnant ses nouvelles propriétés génétiques. Il est possible que lors de la transformation des protoplastes de *S. lividans* TK-24, deux plasmides aient pénétré à l'intérieur de la

cellule. La recombinaison entre des molécules différentes d'ADN d'une même cellule est connue et qualifiée de fréquente chez *S. lividans* TK-24 (Tsai *et* Chen. 1987). Allen et Ritchie (1994) ont connu cette situation en clonant les gènes de biosynthèse de la geldanamycine dans *S. lividans* TK-24, puisqu'une partie des gènes portés par leur plasmide a été incorporée au chromosome. L'instabilité génétique des streptomycètes peut être due à leur chromosome linéaire et à leur mode de réplication (Hinnebusch *et* Tilly. 1993). La fréquence élevée en G+C (Wright *et* Bibb. 1992) de leur ADN est aussi un facteur pouvant favoriser la recombinaison homologue.

Le clone 2.21 produit une très faible quantité de pigment V et il est possible que ce pigment V soit de la thaxtomine A. Comment expliquer alors qu'une souche du même genre, en l'occurrence *S. lividans* TK-24, en acquérant des gènes de *S. scabies*, produise si peu de toxine comparativement à *S. scabies*. Nous pensons que l'ensemble des gènes permettant au clone 2.21 de synthétiser le pigment V auraient pu s'intégrer au chromosome de *S. lividans* TK-24 et l'expression de ces gènes ne serait peut être pas constitutive. Ceci pourrait être dû à l'absence du promoteur des gènes. Il est aussi possible que *S. lividans* TK-24 ne possède pas toute la machinerie protéique nécessaire pour produire efficacement le pigment V. Le fragment d'ADN provenant de *S. scabies* EF-35 s'est peut être intégré devant un promoteur faible ou il aurait besoin d'un activateur de transcription. Dans le cas de la synthèse de la thaxtomine A par *S. scabies*, la subérine suite à sa digestion par une estérase, semblerait libérer un inducteur de transcription pour les gènes de biosynthèse de la thaxtomine A. *S. scabies* possède une estérase qui lui permet vraisemblablement de libérer l'inducteur et de produire de la thaxtomine A (Beauséjour *et al.* 1999). Nous savons que *S. lividans* TK-24 ne produit pas d'estérase, donc la faible production du pigment V (thaxtomine A) pourrait s'expliquer par l'absence d'inducteur.

Même si l'insertion chromosomique complique l'identification de nouvelles régions génétiques, la stratégie que nous pensons employer pour aller rechercher cet ensemble de gènes est la suivante. Extraire d'abord l'ADN chromosomique du clone 2.21 de manière à l'obtenir intact. Couper cet ADN chromosomique avec une enzyme possédant des sites de restriction rares à l'intérieur du génome. Séparer les différents fragments générés par la digestion par une électrophorèse en champs pulsés. Hybrider avec la sonde de 1,7 Kb provenant de la digestion *PvuII* du vecteur pFD666. Comme l'enzyme coupera rarement à l'intérieur du génome, nous pensons obtenir une seule bande pouvant s'hybrider avec la sonde. Le fragment d'ADN de taille appropriée pourra être récupéré en découpant et décrochant l'ADN de la membrane. Ensuite, une digestion suivie d'une ligation et d'une transformation dans *E. coli* sera effectué. Les transformants seront sélectionnés pour la résistance à la kanamycine ou seront hybridés avec la sonde. Nous analyserons les bactéries recombinantes ultérieurement pour leur pouvoir pathogène sur les plantules de radis ainsi que pour la production de pigments jaunes dans le milieu à base de son d'avoine. Nous pensons pouvoir retrouver les gènes de la biosynthèse du pigment V de cette façon. Une fois le reclonage réussi, nous voudrions hybrider ce fragment avec l'ADN de la souche sauvage, *S. scabies* EF-35, pour s'assurer que ce fragment provient réellement de son génome. Le reclonage de ces gènes dans un vecteur possédant un promoteur fort pourra probablement aider à augmenter son expression. Une autre avenue pour augmenter l'expression serait de transformer des mutants de *S. scabies* EF-35 ne produisant plus de thaxtomine A (Goyer *et al.* 1998). Une augmentation dans la production du pigment V permettra d'obtenir suffisamment de produit pour confirmer la structure chimique du composé.

La thaxtomine A n'est pas le seul composé connu à pouvoir causer une nécrose sur des tubercules stériles. Le produit du gène *nec1*, cloné par Bukhalid *et al.* (1997) est aussi capable d'induire une nécrose sur les tissus de pomme de terre lorsque mis en contact avec

ces derniers. La nécrose causée par le composé du gène *nec1* est comparable à celle causée par *S. scabies*. Le composé extracellulaire codé par le gène de 0,67 Kb est incolore et soluble dans l'eau (Bukhalid *et al.* 1998). La possibilité que le clone 2.21 soit porteur du gène *nec1* est peu probable, car les caractéristiques physico-chimiques du pigment V sont totalement différentes du composé codé par le gène *nec1*. Le pigment jaune V est très peu soluble dans l'eau et est de couleur jaune. La seule caractéristique commune entre ces deux composés est la capacité d'induire une nécrose sur les tissus de la pomme de terre similaire à la gale commune. Il semblerait donc que le clone 2.21 soit porteur de gènes de virulence de *S. scabies* non encore caractérisés.

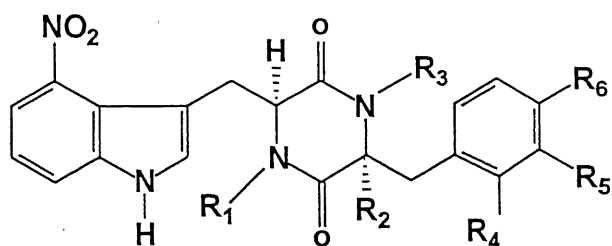
CONCLUSION

La construction d'une banque génomique de *S. scabies* EF-35 et sa transformation dans un hôte hétérologue, *S. lividans* TK-24, nous a permis d'identifier 12 clones pouvant être impliqués dans le pouvoir pathogène de la bactérie. C'est l'analyse du pouvoir pathogène sur les plantules de radis des colonies recombinantes qui nous a permis de sélectionner ces 12 clones. De ces 12 clones, certains inhibaient la croissance des plantules de radis et d'autres semblaient la favoriser. De plus, nous avons caractérisé le clone 2.21 comme étant capable de produire un composé ayant des propriétés chimiques et toxiques similaires à celles de la thaxtominine A. Cependant, les techniques utilisées pour identifier la région génétique codant pour la biosynthèse du composé toxique ont démontré que le plasmide pFD666 et le fragment d'ADN de *S. scabies* EF-35 conférant de nouvelles propriétés au clone 2.21 étaient probablement intégrés au chromosome de la souche d'expression.

L'étude moléculaire du clone 2.21, mais également des autres clones retenus permettra de trouver des régions génétiques codant pour des facteurs de virulence connus ou inconnus de *S. scabies*. Le reclonage des gènes de biosynthèse du pigment V pourrait permettre une meilleure production du composé ainsi que la confirmation de sa structure chimique par RMN. D'avoir ces gènes nous amènera à mieux comprendre le rôle de la thaxtominine A dans le mécanisme de virulence si le pigment V est effectivement de la thaxtominine A. La connaissance des gènes pourrait aussi simplifier l'étude de la voie de synthèse de la thaxtominine A, voie encore inconnue à ce jour. De plus, à partir de ces gènes, des études d'hybridation entre ces régions génétiques et l'ADN d'autres espèces phytopathogènes pourraient être faites pour aider à comprendre l'évolution de ces gènes, ainsi que les mécanismes par lesquelles ils sont transmis. Le clonage et le séquençage des gènes de

biosynthèse du pigment V pourraient aussi servir au développement d'un outil de diagnostique PCR rapide. Ceci serait un grand pas pour les chercheurs, car ces outils faciliteront les études écologiques et permettraient de mieux comprendre les interactions dans le sol entre les bactéries phytopathogènes et les non-pathogènes.

ANNEXE



| Composés | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| 1 | Me | OH | Me | H | OH | H | Thaxtamine A |
| 2 | Me | OH | Me | OH | H | H | |
| 3 | Me | H | H | H | H | H | |
| 4 | Me | OH | Me | H | H | H | Thaxtamine B |
| 5 | Me | H | Me | H | H | H | |
| 6 | Me | OH | H | H | H | H | Thaxtamine C |
| 7 | Me | OH | Me | H | H | OH | |
| 8 | Me | OH | Me | H | OH | OH | |
| 9 | Me | OH | H | H | OH | H | |
| 10 | H | OH | Me | H | OH | H | |

Annexe 1. Structure chimique des thaxtomines produites par *S. scabies*.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN I.W. et D.A. RITCHIE. 1994. Cloning and analysis of DNA sequences from *Streptomyces hygroscopicus* encoding geldanamycin biosynthesis. Mol. Gen. Genet. 243 : 593-599.
- BABCOCK J.M., E.C. ECKWALL et J.L. SCHOTTEL. 1993. Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. J. Gen. Microbiol. 139 : 1579-1586.
- BEAUSÉJOUR J., C. GOYER, J. VACHON et C. BEAULIEU. 1999. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. Can. J. Microbiol. 45: 764-768.
- BUKHALID, R.A., S. Y. CHUNG et R. LORIA. 1998. *Nec 1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp., and linked to a transposase pseudogene. Mol. Plant-Microbe Interact. 11 : 960-967.
- BUKHALID, R. A. et R. LORIA. 1997. Cloning and expression of a gene from *Streptomyces scabies* encoding a putative pathogenicity factor. J. Bacteriol. 179 : 7776-7783.
- DENIS, F. et R. BRZEZINSKI. 1992. A versatile shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycetes. Gene. 111 : 115-118.
- DOERING-SAAD, C., P. KÄMPFER, S. MANULIS, G. KRITZMAN, J. SCHNEIDER, J. ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, H. SCHREMPF et I. BARASH. 1992. Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 3932-3940.
- EGEL, D.S., J.H. GRAHAM et R.E. STALL. 1991. Genomic relatedness of *Xanthomonas compestris* strains causing diseases of citrus. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 2724-2730

FAUCHER, E. B. OTRYSKO, E. PARADIS, N.C. HODGE, R.E. STALL et C. BEAULIEU. 1993. Characterization of *Streptomyces* causing russet scab in Québec. Plant Dis. 77 : 1217-1220.

FAUCHER, E., T. SAVARD et C. BEAULIEU. 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. Can. J. Plant Pathol. 14 : 197-202.

FETT, W.F., H. C. GERARD, L. E. JONES, S. F. OSMAN et R. A. MOREAU. 1994. Production of cutin-degrading enzymes by plant pathogenic bacteria. Pages 641-646. In M. Lamattre, S. Freigoun, k. Rudolph et J.G. Swings eds., Plant pathogenic bacteria, 8th International Conferences, Versailles (France), June 9-12, 1992. Les colloques n° 66, INRA Edition, Paris.

GOYER, C., et C. BEAULIEU. 1997. Host range of Streptomycete strains causing common scab. Plant. Dis. 81 : 901-904.

GOYER, C., E. FAUCHER et C. BEAULIEU. 1996. *Streptomyces caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Québec, Canada. Int. J. Syst. Bacteriol. 46 : 635-639.

GOYER, C., B. OTRYSKO et C. BEAULIEU. 1996. Taxonomic studies on *streptomyces* causing potato common scab : a review. Can. J. Plant Pathol. 18 : 107-113.

GOYER, C., J. VACHON et C. BEAULIEU. 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. Phytopatol. 88 : 442-445.

HALE, V., M. MCGREW, B. CARLSON et J. L. SCHOTTEL. 1992. Heterologous expression and secretion of a *Streptomyces scabies* esterase in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174 : 2431-2439.

HEALY, F.G. et D.H. LAMBERT. 1991. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. Int. J. Syst. Bacteriol. 41 : 479-482.

HINNEBUSCH, J. et K. TILLY. 1993. Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Molecular Microbiol.* 10 : 917-922.

HOOKER, W. J. 1949. Parasitic action of *Streptomyces scabies* on roots of seedlings. *Phytopathol.* 39 : 442-462.

HOOKER, W.J. 1981. Common scab. In *Compendium of potato diseases*, pp. 33-34. Edited by W. J. Hooker. St Paul, MN : American Phytopathological Society.

HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces - A Laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich, 356 pp..

KING, R.R., C.H. LAWRENCE et L.A. CALHOUN. 1992. Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, the causal organisms of potato common scab. *J. Agric. Food Chem.* 40 : 834-837.

KING, R.R., C.H. LAWRENCE et M.C. CLARK. 1991. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *Am. Potato J.* 68 : 675-680.

KING, R.R., C. H. LAWRENCE, M.C. CLARK et L.A. CALHOUN. 1989. Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *J. Chem. Soc.* 13 : 849-850.

KING, R.R. et C.H. LAWRENCE. 1996. Characterization of new thaxtomin A analogues generated *in vitro* by *Streptomyces scabies*. *J. Agric. Food. Chem.* 44 : 1108-1110.

LAWRENCE, C.H., M.C. CLARK et R.R. KING. 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathol.* 80 : 606-608.

LEINER, R. H., B. A. FRY, D. E. CARLING et R. LORIA. 1996. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. Phytopathol. 86 : 709-713.

LEVICK, D. R., T. A. EVANS, C. T. STEPHENS et M. L. LACY. 1984. Etiology of radish scab and its control through irrigation. Phytopathol. 75 : 568-572.

LOCCI, R. 1994. Actinomycetes as plant pathogens. Eur. J. Plant Pathol. 100 : 179-200.

LORIA, R., R.A. BUKHALID, R.A. CREATH, R.H. LEINER, M. OLIVER et J.C. STEFFENS. 1995. Differential production of thaxtomins by pathogenic *Streptomyces* species *in vitro*. Phytopathol. 5 : 537-541

LORIA, R. et D.H. LAMBERT. 1989. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 39 : 387-392

LORIA, R. et D.H. LAMBERT. 1989. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39 : 393-396

LORIA, R., R.A. BUKHALID et B. A. FRY. 1997. Plant pathogenicity in the genus *streptomyces*. Agriculture and Agri-Food Canada, Fredericton, Canada. 81 : 836-846.

MANULIS, S., H. SHAFRIR, E. EPSTEIN, A. LICHTER et I. BARASH. 1994. Biosynthesis of indole-3-acetic acid *via* the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. Microbiol. 140 : 1045-1050.

SAMBROOK J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 545p.

MIYAJIMA, K., F. TANAKA, T. TAKEUCHI et S. KUNINAGA. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48 : 495-502.

PARADIS, E., C. GOYER, N. C. HODGE, R. HOGUE, R. E. STALL et C. BEAULIEU. 1994. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in Eastern Canada. Int. J. Syst. Bacteriol. 44 : 561-564.

PRIDHAM, T.G., C.F. ANDERSON, L.A. LINDENFELSER, C.W. HESSETINE et R.D. BENEEDICT. 1956-57. A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomycetes. Antibiotics Annu. 1956-57 : 947-953.

TAKEUCHI, T., H. SAWADA, F. TANAKA et I. MATSUDA. 1996. Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16S rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 46 : 476-479.

TASHIRO, N., K. MIYASHITA et T. SUZUI. 1990. Taxonomic studies on the *Streptomyces* species, isolated as causal organisms of potato common scab. Ann. Phytopath. Soc. Japan. 56 : 73-82.

TSAI, JF-Y. et CW. CHEN. 1987. Isolation and characterization of *Streptomyces lividans* mutants deficient in intraplasmid recombination. Mol. Gen. Genet. 208 : 211-218.

WRIGHT, F. et M.J. BIBB. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. Gene. 113 : 55-65.